UNIVERSITE DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1950-1951 — N° 358

RECHERCHES SUR LA DIGITALINE OFFICINALE

et quelques autres hétérosides cardiotoniques

Leur identification dans les préparations galéniques

Travail du Laboratoire de Pharmacie
Professeur : G. VITTE

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « Pharmacie »

Présentée et soutenue publiquement le Lundi 2 Juillet 1951

PAR

Jacques DEVÈZE

PHARMACIEN

Né à Bordeaux (Gironde), le 8 Février 1927

Examinateurs de Thèse

MM. MESNARD, professeur ..... *Président*
CHELLE, professeur .....
VITTE, professeur ..... *Juges*
CASTAGNOU, professeur ...

BORDEAUX
IMPRIMERIE Vve VASSAL
58, Rue du Sablonat

1951

UNIVERSITE DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1950-1951 — N° 358

RECHERCHES SUR LA DIGITALINE OFFICINALE

et quelques autres hétérosides cardiotoniques

Leur identification dans les préparations galéniques

Travail du Laboratoire de Pharmacie
Professeur : G. VITTE

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention « Pharmacie »

Présentée et soutenue publiquement le Lundi 2 Juillet 1951

PAR

Jacques DEVÈZE

PHARMACIEN

Né à Bordeaux (Gironde), le 8 Février 1927

Examinateurs de Thèse :

MM. MESNARD, professeur ..... *Président*
CHELLE, professeur ..... *Juges*
VITTE, professeur ..... *Juges*
CASTAGNOU, professeur ... *Juges*

BORDEAUX
IMPRIMERIE Vve VASSAL
58, Rue du Sablonat

1951

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN HONORAIRE : M. DUPÉRIÉ.
DOYEN : M. PORTMANN. — ASSESSEUR : M. CHELLE.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, PETGES, GUYOT, ANDERODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, PERY, LABAT, CHARRIER, DUBREUIL.

PROFESSEURS :

	MM.		MM.
Clinique médicale	DUPÉRIÉ	Zoologie et parasitologie	R. SIGALAS
id.	CREYX	Médecine expérimentale	AUBERTIN
Clinique chirurgicale	PAPIN	Clinique ophtalmologique	BEAUVIEUX
id.	MASSE	Clinique chirurg. inf. et orthop.	LOUBAT
Clinique d'accouchements	RIVIÈRE	Clin. des maladies infectieuses	N...
Anatomie pathol. et microsc. clin.	DE GRAILLY	Chimie biologique et médicale	TAYEAU
Anatomie	VILLEMIN	Physique méd. et pharmaceutique	PIFFAULT
Anatomie générale et histologie.	MAYER	Méd. col. et clin. mal. exotiques.	BONNIN
Hygiène et Clin. de la tuberc.	PIÉCHAUD	Clin. malad. cutanées et syphilit.	JOULIA
Méd. légale et méd. du trav.	DERVILLÉE	Clin. des mal. des voies urinaires.	DARGET
Electroradiol. et clin. d'él. médic.	REBOUL	Clin. mal. nerveuses et mentales.	DELMAS-MARSALET
Chimie	CHELLE	Clin. oto-rinho-laryngologique	PORTMANN
Matière médicale	GOLSE	Toxicologie et hygiène appliquée.	CASTAGNOU
Pharmacie	VITTE	Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ
Physiologie	FABRE	Botanique et Cryptogamie	GIRARD
Clin. méd. des mal. des enfants	FONTAN	Thérapeutique	BROUSTET

PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL :

M. MESNARD.

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM. PERRENS (Maladies mentales), DUFOUR (Anatomie), MESNARD BLANQUET (Physique pharmaceutique).

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES :

	MM.		MM.
Parasitologie	PAUTRIZEL	Pharmacie (1re section)	R. GOLSE
Physiologie	Mlle ROUGIER	Pharmacie (2e section)	MASQUELIER
Bactériologie	MOUSTARDIER	Pharmacie (3e section)	CAZAUX

AGREGES EN EXERCICE :

	MM.		MM.
Médecine générale	SARIC	Ophtalmologie	BESSIÈRE
id.	DUBARRY	Oto-rhino-laryngologie	DESPONS
id.	J.-F. TRAISSAC	Dermatologie et syphiligraphie	LE COULANT
id.	BERGOUIGNAN	Histologie	N...
id.	LENG-LEVY	Pédiatrie et puériculture	VERGER
Chirurgie générale	POUYANNE	Médecine légale et Médecine du trav.	L'EPEE.
id.	LAUMONIER	Electro-radiologie	LACHAPELE
id.	CHAVANNAZ	Odonto-stomatologie	MARONNEAUD
Chimie biologique	N.	Urologie	LANGE
Obstétrique	MAHON		
id.	CHASTRUSSE		

COURS COMPLEMENTAIRES :

	MM.		MM.
Médecine opératoire	DUFOUR	Pharmacie galénique	MESNARD
Accouchements	MAHON	Organographie et physiologie végét.	TEMPERE
Puériculture	PERY	Chimie biologique	NEUZIL
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI	Pathologie chirurgicale	LAUMONIER
id.	COUSTOU	id.	VILLAR
Anatomie	RIGAUD	Hydrologie pharmaceutique	BAILENGER
Chimie minérale	BABIN	Zoologie pharmaceutique	CAZAUX
Cryptogamie	LAUBIE		

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MON PERE ET A MA MERE

En faible gage de ma reconnaissance affectueuse.

A MA FIANCEE

A MA FAMILLE

A MES AMIS

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY DE THESE

Monsieur le Professeur CASTAGNOU

Professeur de Toxicologie et Hygiène appliquée,
Pharmacien des Hôpitaux psychiatriques.

Hommage respectueux

Monsieur le Professeur VITTE

Professeur de Pharmacie,
Pharmacien des Hôpitaux,
Officier de l'Instruction Publique.

Qui a bien voulu nous admettre dans son laboratoire

Monsieur le Professeur CHELLE

Professeur de Chimie,
Membre correspondant de l'Académie de Médecine,
Chevalier de la Légion d'Honneur,
Officier de l'Instruction Publique,
Chevalier de l'Ordre de la Santé Publique.

En reconnaissance de la bienveillance qu'il nous a toujours témoignée

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur MESNARD

Officier d'Académie.

Qui, au cours de ces deux années de travail, n'a cessé de nous faire profiter de ses conseils éclairés.

Qu'il nous soit permis de lui offrir ici l'expression de notre vive et respectueuse gratitude pour l'aide inlassable qu'il nous a prodiguée au cours de l'élaboration de cette thèse dont le sujet est sien.

INTRODUCTION

L'emploi de techniques analytiques toujours plus sensibles, nous amène à modifier nos conceptions sur la pureté de certains corps ; c'est ainsi que des méthodes chromatographiques ont montré que la digitaline cristallisée officinale n'est pas constituée uniquement par du digitoxoside, les différents auteurs n'étant pas absolument d'accord sur la nature des impuretés. Nous avons essayé d'appliquer la chromatographie sur papier à l'étude de cette drogue, dans le but d'en déterminer la composition exacte, et aussi à celle de ses produits d'hydrolyse, génols et digitoxose. Il nous était indispensable d'avoir à notre disposition une réaction très sensible et pouvant être utilisée sur un papier chromatographique, ce qui impliquait l'étude systématique des réactions classiques des hétérosides digitaliques.

Il nous a paru intéressant d'étendre nos recherches à quelques autres hétérosides utilisés en pharmacie : Lanatahétéroside C, Oléandroside, Ouabaïoside ; et nous avons pensé qu'il nous serait peut-être possible de mettre au point un nouvel essai des médicaments cardiotoniques hétérosidiques.

Après un rappel des techniques chromatographiques sur colonne et sur papier, nous décrirons les recherches que nous avons entreprises et les résultats auxquels nous sommes parvenu.

PREMIERE PARTIE

ETUDES PRELIMINAIRES

CHAPITRE PREMIER

GENERALITES SUR LA CHROMATOGRAPHIE

La chromatographie est une méthode analytique inventée en 1906 par le botaniste russe Tswett [1]. Elle consiste à séparer ou à purifier différentes substances minérales ou organiques par fixation sur une substance adsorbante, préalablement introduite dans une colonne en verre. D'abord appliquée aux pigments colorés des végétaux, elle fut ensuite étendue à des composés incolores.

En 1941, Martin et Synge [2] indiquèrent une méthode dite de chromatographie de partage : une solution de la substance à étudier est filtrée sur une colonne d'un support solide imbibée d'un autre solvant non miscible avec le premier. Les auteurs utilisent le gel de silice imbibé d'eau et un mélange de chloroforme et de butanol ; les substances dissoutes se séparent d'après leur coefficient de partage entre l'eau et le solvant organique : les plus solubles dans ce dernier seront entraînés plus loin que les substances hydrosolubles, le gel de silice ne jouant ici que le rôle de support d'eau.

En 1944, Consden, Gordon et Martin [3], ayant remarqué que les coefficients de partage entre solvant et eau étaient les mêmes en présence de cellulose qu'en son absence, remplacent la colonne de gel de silice par du papier filtre : cette substance agit donc comme un support inerte ; son emploi avait déjà été proposé longtemps auparavant par

Schönbein et Grappelsröder [4]. Ils mirent ainsi au point la méthode dite de « chromatographie de partage sur papier ».

Nous décrirons donc ici la méthode par chromatographie sur colonne et la méthode par chromatographie sur papier dont nous serons amené à parler au cours de ce travail.

A. - **Chromatographie sur colonne.**

Les premiers essais d'adsorption sur particules insolubles datent de très longtemps. On peut citer comme exemple la décoloration sur noir animal. En 1897, Day [5] purifiait l'huile brute de pétrole de Pensylvanie en la faisant passer à travers un long tube de verre contenant de la terre à foulon; mais comme nous venons de le voir, c'est Tswett qui est considéré comme le précurseur de la méthode. Dans son ouvrage « Chromophylles dans le monde végétal et animal », il décrit une méthode de séparation des pigments des feuilles vertes. Cependant, l'analyse chromatographique n'entra dans la technique courante des laboratoires chimiques qu'avec les travaux de Kuhn et Lederer [6] qui séparèrent les carotènes des xanthophylles en 1931.

En 1938, Reichstein [7] met au point le « chromatogramme liquide » permettant la séparation de substances incolores. La technique est simple, et a subi peu de modifications ; elle consiste à verser sur une certaine quantité d'un adsorbant contenu dans un tube de verre, une solution du mélange de corps à séparer, ceci pouvant s'effectuer sous pression réduite ou non. Il en résulte une séparation des substances dissoutes qui s'étagent à des niveaux différents de la colonne, pour autant que le solvant et l'adsorbant aient été judicieusement choisis.

Voici d'après Tswett, et comme le signale Lederer [8] comment ce résultat est atteint : supposons trois substan-

ces possédant vis-à-vis d'un adsorbant des affinités différentes, et supposons la colonne séparée en plusieurs couches identiques et successives. La substance ayant le plus d'affinité chimique pour l'adsorbant occupera toutes les places de la première couche; la solution dépourvue de cette substance, continuera son cheminement à travers la colonne, tandis que le corps possédant maintenant le plus d'affinité pour l'adsorbant se fixera à son tour sur la seconde couche, et ainsi de suite.

Les substances sont maintenant fixées, il s'agit de les récupérer et pour cela de les localiser.

Dans le cas des substances colorées, on peut : soit expulser la colonne du tube et découper les différentes zones ; soit, pour les colonnes de grand diamètre, enlever couche après couche à l'aide d'une petite cuiller ; soit enfin continuer le développement jusqu'à ce que les zones colorées passent dans le filtrat ; on change évidemment de récipient après chaque zone. C'est le « chromatogramme liquide » de Reichstein [7].

Dans le cas des substances incolores, on peut : soit tracer au pinceau un mince trait d'un réactif approprié sur un côté de la colonne ; soit prélever de place en place un échantillon de matière adsorbante et le porter dans une goutte de réactif; soit additionner la solution de substances incolores d'un colorant dont l'affinité chimique a été reconnue identique à celle du corps que l'on veut séparer; soit faire appel à l'ultra-chromatographie qui consiste à révéler certaines substances par leur fluorescence dans l'ultra-violet.

Tiselius [9] a enrichi la technique chromatographique de deux procédés, connus sous le nom d'analyse frontale et de développement par déplacement.

L'analyse frontale consiste à faire couler continuellement la solution des substances à étudier à travers la co-

lonne et mesurer la concentration des substances sortant de la colonne par un dispositif optique indiquant les changements de l'indice de réfraction. Le degré d'adsorption des divers composés est exprimé par le volume spécifique de rétention, c'est-à-dire le volume de liquide passant sur une colonne d'un gramme d'adsorbant, avant que le corps en question ne sorte de la colonne.

Le développement par déplacement consiste à déplacer de la colonne la substance la moins adsorbée par une solution d'une substance très fortement adsorbée ; le composé peu adsorbé est chassé le premier, puis, successivement ceux qui sont de plus en plus adsorbés; finalement, il ne reste dans le tube que la substance employée comme « déplaceur ».

B. - **Chromatographie sur papier.**

La technique est la suivante : le papier se trouve dans un récipient étanche saturé de vapeur d'eau et de vapeur du solvant organique, et sert de support à la phase aqueuse. On dépose, au début de l'essai, une goutte de la solution à étudier sur un coin du papier et on suspend la feuille verticalement avec son bord supérieur immergé dans une cuve contenant un solvant non miscible à l'eau, mais qui en est saturé. Le solvant coule lentement le long du papier et les substances se déplacent suivant leur coefficient de partage. Ce procédé est dit « chromatographie descendante ». Williams et Kirby [10] simplifient l'appareillage en roulant les feuilles de papier en cylindres placés debout dans un cristallisoir contenant le solvant; ce dernier monte par capillarité et entraîne les substances à étudier dont une goutte de leur solution a été préalablement déposée au bas de la feuille. Ce procédé de « chromatographie ascendante » a l'avantage, d'après les auteurs, de présenter des séparations encore plus nettes qu'avec l'écoulement par gravité.

Une fois que le solvant a parcouru une certaine distance, on arrête l'opération, évapore le solvant et révèle la position des corps séparés au moyen de réactifs appropriés, ce que l'on appelle la révélation des spots.

Pour un solvant donné, l'emplacement d'une substance est caractérisé par son Rf, c'est-à-dire le rapport de la distance parcourue par la substance à la distance parcourue par le solvant :

$$Rf = \frac{\text{distance parcourue par substance}}{\text{distance parcourue par solvant}}$$

Si la séparation des éléments à étudier n'a pas été satisfaisante, on peut parfaire l'opération en la faisant suivre d'une opération similaire, où l'on emploie un solvant différent que l'on fait progresser dans la direction perpendiculaire à celle de la première expérience, avant, bien entendu, la révélation des spots. On réalise ainsi un « chromatogramme à deux dimensions ».

La méthode est d'une grande simplicité, comme nous le voyons; toutefois, différents facteurs interviennent dans la marche du processus :

— *la nature du papier filtre* et son épaisseur, car la progression des corps à analyser en dépend. On peut évidemment étudier sur la même feuille plusieurs solutions à la fois, par exemple la solution à séparer et des solutions des corps purs que l'on suppose se trouver dans le mélange analysé.

— *la nature du solvant ;* la grande majorité des auteurs utilisent un solvant non miscible à l'eau, mais pouvant en dissoudre une quantité appréciable ; tels sont le phénol saturé d'eau, le butanol saturé d'eau, la collidine saturée d'eau... ou encore un mélange de solvants : butanol-acide acétique-eau... Cependant, il est possible de procéder à

une séparation convenable dans des conditions différentes au moyen d'un mélange de solvants miscibles entre eux ; il ne s'agit pas à proprement parler d'une chromatographie de partage, mais de l'entraînement plus ou moins facile d'une substance par le solvant mis en œuvre. Jaminet [11] a séparé par un mélange éther-méthanol-chloroforme et un mélange éther-chloroforme le K-strophantoside, la K-strophantidine, et l'ouabaïoside. Nous avons nous-mêmes, au cours de nos recherches, obtenu d'excellents résultats avec des mélanges similaires. Quoi qu'il en soit, les solvants ne doivent pas donner de réactions parasites dans les conditions de l'expérience.

— *les révélateurs employés :* ils sont parfois physiques; rayons ultra-violets pour les corps fluorescents, compteur à électrons pour les corps radio-actifs... Ils sont plus généralement chimiques; dans ce cas, le réactif ne doit pas altérer le papier. On peut le pulvériser sur la feuille à révéler ou bien tremper celle-ci dans une cuve contenant le réactif.

— *la température:* elle doit être vérifiée rigoureusement, car son influence est prépondérante. C'est ainsi que pour le glycocolle, une augmentation de température de 10° fait passer le Rf de 0,41 à 0,44 dans le phénol, et de 0,25 à 0,06 dans la collidine.

— *les sels minéraux :* ils peuvent modifier les Rf; de plus ils s'ionisent et leurs ions peuvent être entraînés et donner des taches qu'il ne faut pas confondre avec celles des corps à identifier.

L'application de cette méthode est déjà très étendue : alcaloïdes (Munier et Machebœuf) [12], glucides (Partridge [13]; Mme Blass, Machebœuf et Nunez [14]; Montreuil) [15], acides chlorés (Renard) [16], acides aminés (Dent) [17]. D'autre part, la chromatographie sur papier n'est pas seulement une méthode qualitative; elle permet aussi le dosage des élé-

ments séparés. Le procédé le plus simple consiste à éluer chaque composé dans un solvant convenable et à le doser par une méthode colorimétrique ou volumétrique spécifique. Il suffit pour cela de localiser chacun de ces corps par la révélation d'un chromatogramme témoin et de découper la région du papier qui correspond à la substance à doser sur un chromatogramme non encore révélé.

Signalons aussi le procédé préconisé par Polson [18] pour les acides aminés qui consiste à comparer l'intensité des taches obtenues à la ninhydrine avec une série de taches fournies par des dilutions connues d'acides aminés.

Enfin on a remarqué que la surface des taches était proportionnelle au logarithme des concentrations des corps dans la goutte originelle.

Pour terminer, nous rapporterons la conclusion d'une conférence de Kayser [19] en 1949 : « La microchromatographie sur papier a moins de cinq ans d'existence ; elle permet, sur des prises d'essai minimes, de caractériser et de doser des corps ; elle permet d'isoler et d'identifier des corps nouveaux ; grâce à elle de nombreux problèmes touchant la structure et le métabolisme de la matière vivante pourront être, j'en suis sûr, élucidés dans un proche avenir ».

C'est cette méthode que nous avons essayé d'appliquer à l'étude de divers hétérosides cardiotoniques actuellement utilisés en thérapeutique, et de leurs produits d'hydrolyse. Pour mener à bien ce travail, il était indispensable d'avoir à notre disposition des réactions colorées suffisamment sensibles applicables à la chromatographie sur papier.

CHAPITRE II.

REACTIONS COLOREES DES HETEROSIDES CARDIOTONIQUES ET DE LEURS PRODUITS D'HYDROLYSE

Les hétérosides cardiotoniques s'hydrolysent, sous l'influence des acides étendus, en aglucone ou génol, et en sucre. La plupart des recherches ont porté sur la digitaline (1) pour laquelle un grand nombre de réactions d'identité ont été étudiées (2); mais les sensibilités n'ont pas toujours été précisées et on ignore très souvent à quelle partie de la molécule est due la réaction. Nous les avons étudiées à ce double point de vue, dans le but de les appliquer à l'analyse chromatographique, et les avons étendues aux autres hétérosides étudiés.

Nous envisagerons successivement les réactions dues aux génols, les réactions dues au sucre, et les réactions dues aux deux constituants des hétérosides. Nous avons opéré sur les génols isolés, après hydrolyse de la digitaline, suivant la méthode de Kedde [20] qui sera exposée ultérieurement, et sur du digitoxose pur (3).

A. - DIGITALINE.

1° Réactions dues aux génols.

Nous nous sommes assuré que les réactions de ce groupe sont négatives avec le digitoxose.

(1) Nous appellerons Digitaline le produit utilisé en pharmacie, le terme digitoxose désignant uniquement l'hétéroside pur.

(2) On pourra consulter avec profit les ouvrages suivants :
Bellet : *Annales pharmaceutiques française*, 1950, 6, 471.
Mesnard et Devèze : *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 1950, III, 109.

(3) Le digitoxose, ainsi que les autres sucres que nous avons étudiés au cours de ce travail, le cymarose et l'oléandrose, nous ont été aimablement fournis par MM. les Professeurs Stoll et Reichstein, de l'Université de Bâle, et par M. J.-K.-N. Jones, de l'Université de Bristol. Nous sommes heureux de leur adresser nos plus vifs remerciements.

1. **Réaction de Legal** [21]. — Cette réaction, improprement appelée « test de Legal », a été décrite par Jacobs, Hoffman et Gustus [22], et utilisée depuis par de nombreux auteurs : la solution alcoolique de l'hétéroside est alcalinisée par une solution d'hydroxyde de sodium, puis additionnée d'une solution à 1 pour cent de nitroprussiate de sodium. Le liquide se colore en rouge.

Elderfield [23] critique ce test et propose l'usage de ferricyanure de potassium à la place de nitroprussiate. Hardegger, Heusser et Blank [24], ont montré que la réaction de Legal n'est pas spécifique du groupe buténolide mais que certains produits synthétiques donnent aussi une réaction positive.

Kedde [20] a remarqué que l'intensité de la coloration augmente avec le titre alcoolique de la solution et que d'autre part, cette coloration, très instable, normalement, perd cet inconvénient en milieu tamponné à pH = 11, ce qui a même permis un dosage photométrique.

Nous avons obtenu d'excellents résultats par la technique suivante : après avoir agité l'hétéroside avec la solution alcoolique de nitroprussiate, on fait arriver sans mélanger, au fond du tube où se fait la réaction, un égal volume de solution d'hydroxyde de sodium à 10 pour cent. Au bout de quinze secondes, nous obtenons de bas en haut: une couche jaune limpide, une couche jaune trouble, une couche rose ou rouge dont la coloration dure quatre à cinq minutes, mais est bientôt gênée par la coloration jaune qui tend à diffuser.

D'après les auteurs précités, la réaction de Legal n'est positive que pour 0,5 mg.; notre méthode permet de caractériser 20 μg. dans 1 ml.

2. **Réaction de Baljet** [25]. — On mélange des volumes égaux de solution alcoolique d'hétéroside et de réactif (solution à 1 pour cent d'acide picrique purifié : 95 ml. ;

solution d'hydroxyde de sodium à 10 pour cent : 5 ml.). Il se développe une coloration rouge orangé, comparable à celle d'une solution de dichromate de potassium, et qui se prête à un dosage colorimétrique, étudié par Bell et Krantz [26], et par Kedde [20].

Les différents auteurs ne sont pas d'accord sur la partie de la molécule responsable de la coloration ; tandis que Wasicky et ses collaborateurs [27] l'attribuent au sucre, Lendle et Schmelzer [28] ont montré que l'intensité de coloration était plus forte avec les génols purs qu'avec les hétérosides et notent une action empêchante du sucre. Nous avons pu vérifier que la réaction est négative avec le digitoxose.

Nous avons obtenu des résultats satisfaisants en opérant comme suit : mettre dans un tube à essais 1 ml. de solution alcoolique d'hétéroside, 1 ml. d'une solution aqueuse d'acide picrique à 1 pour cent et quelques gouttes d'une solution d'hydroxyde de sodium à 10 pour cent. La réaction est positive pour 10 µg. de digitoxoside; mais la coloration n'est pas immédiate; elle apparaît rapidement pour 50 µg., mais instantanément qu'à partir de 100 µg. De toutes façons, la teinte acquiert son maximum d'intensité au bout de vingt minutes.

Si l'on remplace l'hydroxyde de sodium par de l'hydroxyde de tétra-éthyl-ammonium, comme l'ont fait Bell et Krantz [26], on peut caractériser 5 µg. d'hétéroside.

3. **Réaction de Morel et Marthoud.** [20]. — L'hétéroside est dissous dans une solution alcoolique fraîche de m-dinitro-benzène, puis est additionné de quelques gouttes d'une solution d'hydroxyde de sodium à 20 p. cent. Il apparaît une coloration bleu foncé, qui persiste pendant quelques minutes à la température ordinaire, et est détruite immédiatement par chauffage. Anderson et Chen [30] conseillent d'ailleurs de maintenir les tubes où se fait la réaction dans de la glace pilée pendant cinq à dix minutes.

Zimmermann [31], puis Pesez [32] ont montré que cette réaction est positive avec les cétostéroides possédant un groupement CH_2 voisin du carbonyle en 3 ou 17.

D'après Morel et Marthoud, la réaction est donnée par 100 µg. d'hétéroside, mais nous avons obtenu une coloration rose violacé très nette avec 2 µg. et une coloration bleu clair à partir de 5 µg. La substitution de l'hydroxyde de tétra-éthyl-ammonium ne présente pas d'intérêt, puisque elle ne permet de caractériser que 15 µg.

4. **Réaction de Kedde** [20]. — Kedde reprend une réaction déjà utilisée pour caractériser la créatinine : on mélange 5 ml. d'une solution à 2 p. cent d'acide 3-5 dinitrobenzoïque dans l'alcool à 95° et 9 ml. d'alcool à 95°. On verse alors 2 ml. d'une solution normale d'hydroxyde de sodium. On agite et porte au bain-marie à 20°, dans l'obscurité pendant 30 minutes : il se développe une coloration rouge violette qui persiste environ 50 minutes.

5. **Réaction de Warren, Howland et Green** [33]. — Les auteurs utilisent comme réactif le β-naphtoquinone 4 sulfonate de sodium déjà employé par Ehrlich et Herter [34]; Feigl et Frehden [35]... pour la recherche des groupements méthylène actifs : on dilue 0,1 à 1 ml. d'une solution alcoolique de l'échantillon avec de l'eau jusqu'à 2,5 ml.; on chauffe exactement une minute à 100°; on ajoute alors une goutte de réactif à 1 pour cent dans de l'éthanol à 50° et une goutte d'hydroxyde de sodium à 0,5 N. On attend 10 minutes; il se développe une coloration pourpre qui atteint son maximum en 90 secondes; on ajoute alors une goutte d'acide acétique 2 N; la coloration jaune qui se produit après l'addition de l'acide est stable pendant plusieurs heures et peut être extraite avec du phtalate de butyle.

Cette réaction a permis aux auteurs de catactériser 50 µg. d'hétéroside; nous avons montré qu'elle était encore positive avec 20 µg.

6. **Réaction de Mc Chesney, Nachod, Auerbach et Laquer** [36]. — Cette réaction est fournie par les génols libérés par l'hydrolyse du digitoxoside et du gitoxoside qu'elle permet de différencier. Si l'on ajoute à une parcelle de génol de l'acide sulfurique pur, le digitoxigénol fournit une coloration jaune pâle qui fonce graduellement, alors que le gitoxigénol donne une teinte rouge qui atteint son maximum au bout de vingt-quatre heures et reste inchangée pendant plusieurs jours. Les auteurs ont déterminé les spectres d'absorption : à 250 mμ le coefficient du gitoxigénol est égal à 10 fois celui du digitoxigénol.

7. **Réactions de fluorescence.** — Svendsen et Jensen [37] ont montré que la fraction aglucone est responsable de la fluorescence que présentent les hétérosides dans l'ultraviolet, en présence d'une solution à 25 p. cent d'acide trichloracétique, après chauffage à 100° pendant deux minutes.

Cette réaction permet de différencier le purpurea hétéroside A et le digitoxoside, qui donnent une fluorescence rosée faible, du purpurea hétéroside B et du gitoxoside qui donnent une fluorescence bleu vert intense.

Signalons également que Petit, Pesez, Bellet et Amiard [38] ont dosé le gitoxoside dans la digitaline en mettant à profit sa fluorescence en milieu phosphorique, alors que le digitoxoside reste obscur en lumière de Wood.

Dans les deux cas, la sensibilité de la réaction est de l'ordre du μg.

Remarque. — Nous ne pouvons passer sous silence la réaction de Kiliani due aux génols à l'exception du digitoxigénol; elle n'est donc pas donnée par le digitoxoside. Elle consiste à mettre au contact de l'hétéroside quelques gouttes de réactif de Kiliani (1 ml. d'une solution aqueuse de sulfate de fer III à 5 p. cent et 100 ml. d'acide sulfuri-

que concentré); il apparaît d'abord une coloration jaune, qui vire au rouge puis au violet.

2° Réactions dues au digitoxose.

1. **Réaction de Lafon** [39]. — On humecte un cristal d'hétéroside par une goutte d'un mélange alcool-acide sulfurique à volumes égaux; on chauffe légèrement jusqu'à apparition d'une teinte jaune commune à tous les hétérosides; on verse alors un égal volume d'une solution aqueuse très diluée de perchlorure de fer : il apparaît une coloration vert bleu intense, qui, d'après Garnier, se rapproche davantage du bleu lorsque le digitoxoside est plus pur. Charonnat [40] propose la substitution du nitrobenzène au chlorure ferrique pour augmenter la spécificité de la réaction.

La limite de sensibilité est de 20 μg. de substance, coloration bleu clair; à 200 μg. elle est bleu violet grisâtre. Avec une solution alcoolique d'hétéroside, la réaction est tout juste perceptible pour 200 μg.

2. **Réaction de Keller à l'acide chlorhydrique.** — Keller a signalé que la digitaline chauffée en préférence d'acide chlorhydrique concentré se colore en vert. Cette réaction est mentionnée au Codex et dans l'Officine de Dorvault.

La réaction est positive pour 20 μg, ; et la coloration augmente d'intensité jusqu'à 200 μg ; au delà de cette quantité, il apparaît une coloration rose fugace puis vert olive et enfin vert bleu. Les résultats sont peu nets avec une solution alcoolique de digitoxoside.

3. **Réaction de Keller** [41] **à l'acide sulfurique et au sulfate ferrique.** — On dissout l'hétéroside dans 1 ml. du réactif (100 g. d'acide acétique cristallisable et 1 ml. d'une solution aqueuse à 1 p. cent de sulfate de fer III). Puis on ajoute sans mélanger 1 ml. d'acide sulfurique pur. A la surface de séparation apparaît un anneau bleu plus ou

moins large (surmontant une zone brune), dont la coloration diffuse peu à peu dans l'acide acétique; finalement, on distingue de bas en haut, trois couches : incolore, brune, bleue.

Nous rappellerons que cette réaction est le plus souvent combinée à celle de Kiliani pour la caractérisation des hétérosides digitaliques; elle est donnée par les trois hétérosides : digitoxoside, gitoxoside, gitaloside, tandis que celle de Kiliani n'est positive que pour les deux derniers.

Cloetta et Fischer [42], puis James, Laquer et Mc Intyre [43] ont appliqué cette réaction au dosage des hétérosides dans les feuilles de digitale.

4. **Réaction de Sanchez** [44]. — On dissout l'hétéroside dans deux à trois ml. d'acide acétique cristallisable, puis on ajoute vingt gouttes d'une solution de vanilline à 0,3 p. cent dans l'acide chlorhydrique concentré. Après chauffage au bain-marie pendant trois minutes, il se développe une coloration bleu indigo.

La sensibilité est du même ordre que celle de Keller à l'acide chlorhydrique.

5. **Réaction de Binz** [45]. — D'après cet auteur, l'eau de brome ajoutée à une solution de digitaline dans l'acide sulfurique la rougit instantanément. Nous avons effectué cette réaction, mais une solution de digitoxose ou de digitaline dans l'acide sulfurique se colore en vert puis passe assez rapidement au brun marron; l'addition d'eau de brome modifie immédiatement la teinte verte en brun marron. Nous n'avons jamais pu obtenir la coloration rouge.

6. **Réaction dite de Brissemoret-Derrien** [46]. — Cette réaction a été signalée par Garnier [47]; elle consiste à dissoudre un peu d'hétéroside dans un réactif glyoxylique obtenu en réduisant une solution aqueuse d'acide oxalique

par l'amalgame de sodium. L'addition, sans mélanger, d'acide sulfurique concentré fait apparaître un anneau vert à la limite des deux liquides.

Nous avons pu caractériser par cette méthode 20 µg.

7. **Réaction d'Arreguine et Pasqualis** [48]. — Quelques parcelles de digitaline chauffées en présence de 2 ml. d'acide acétique contenant 1 p. cent d'acide chlorhydrique et quelques milligrammes de xanthydrol, se colorent en rouge intense.

La réaction est très nette à partir de 10 µg. de digitaline.

8. **Réaction d'Ulrix** [49]. — L'auteur signale que des cristaux de digitaline chauffés au bain-marie quelques minutes en présence d'un gramme environ d'acide trichloracétique se colorent en vert.

A partir de 20 µg., on obtient une coloration jaune verdâtre, il faut atteindre 55 µg. pour arriver à une teinte nettement verte.

9. **Réaction de Jaminet** [11]. — Le réactif utilisé est une solution, de 10 grammes de trichlorure d'antimoine dans 10 grammes d'anhydride acétique. L'hétéroside est dissous dans 1 ml. du réactif, on chauffe au bain-marie à 75°. Pendant trois minutes exactement, puis on refroidit sous un courant d'eau.

On obtient une coloration violette peu stable, mais nette pour 35 µg.

3° Réactions dues aux génols et au sucre.

1. **Réaction à l'acide sulfurique.** — Elle est indiquée au Codex et dans l'Officine de Dorvault; l'acide sulfurique dissout la digitaline en donnant une coloration vert noirâtre. Il en est de même si l'on ajoute l'acide à une solution d'hétéroside. Pour une solution à 100 µg. par ml., la

coloration verte initiale passe rapidement au brun; elle est d'autant plus fugace que la concentration augmente, la teinture brune tendant alors vers le marron noir, tandis que la solution acquiert un aspect goudronneux. Au-dessous de 100 µg. par ml., on obtient une coloration jaune pâle à jaune brune. Si l'on ajoute l'acide sulfurique sans le mélanger avec la couche alcoolique, il se forme à la zone de séparation un anneau vert surmontant une liqueur colorée en brun.

L'anneau est visible pour 1 ml. de solution contenant 20 µg. de substance.

Nous avons vu au sujet de la réaction de Mc Chesney, que les génols se colorent sous l'action de l'acide sulfurique; nous nous sommes rendu compte, nous mêmes, que le digitoxose donne une coloration brunâtre.

2. **Réaction de Fröhde** [50]. — On mélange 1 ml. de solution alcoolique de digitoxoside avec une solution à 1 p. cent de molybdate d'ammonium dans l'acide sulfurique concentré. La coloration varie non seulement avec la quantité d'hétéroside, mais, pour une même quantité de ce dernier, avec celle du réactif mis en œuvre, comme le montre le tableau ci-dessous :

	Poids d'hétéroside en µg.	Coloration.
XX gouttes du réactif.	20	Jaune.
	150	Vert jaune passant au brun.
	200	Jaune vert, puis vert clair, puis vert olive fonçant rapidement.

	Nombre de gouttes de réactif.	Coloration
1 ml. de sol. alcoolique contenant 1 mg. de digitoxoside.	5	Bleu vert très faible.
	10 à 50	Vert de plus en plus foncé.
	50	Vert brunâtre.
	60	Vert brunâtre, liquide louche, consistance goudronneuse.

Si l'on ajoute le réactif à la solution sans mélanger, il se forme un anneau bleu; la coloration diffuse d'abord dans la couche alcoolique puis dans la couche sulfurique. Elle est très stable; au bout de cinq jours, elle est encore intacte. Nos expériences ont montré qu'elle est fournie aussi bien par le digitoxigénol que par la digitoxose.

Quoi qu'il en soit, c'est une excellente réaction qui permet de déceler 5 μg. dans 1 ml.

3. **Réaction de Sanchez au p-diméthylamino-benzaldéhyde** [44]. — Sanchez a préconisé l'emploi d'un réactif à base de p-diméthyl amino-benzaldéhyde, composé souvent utilisé pour la caractérisation de nombreuses substances, en particulier les alcaloïdes, par Wasicky [51] (atropine, hyoscyamine, scopolamine, atropamine), Van Urk [52] (ergot de seigle), Malowan [53] (yohimbine), Mesnard [54] (ésérine, strychnine)... Sanchez mélange une solution de 0,10 g. de p-diméthylamino-benzaldéhyde dans 20 ml. d'alcool à 95° à quatre gouttes d'acide sulfurique concentré (d = 1,83). Ce réactif donne une coloration rouge éosine en présence d'acide acétique avec la digitaline allemande dont le principe actif est le digitalinum verum de Kiliani ou digitaloside des semences de la digitale pourprée, tandis que elle est négative avec le digitoxoside. Il attribue la coloration à la fraction agluconique, c'est-à-dire, au digitaligénol.

Il résulte de nos recherches que cette réaction est applicable au digitoxoside sur papier chromatographique; si on dépose, en effet, sur celui-ci, une goutte de la solution de digitaline à 1 pour cent, et qu'après avoir évaporé le solvant, on pulvérise le réactif de Sanchez, on obtient une belle coloration violette qui nous a été donnée également par le digitoxose dans les mêmes conditions.

La sensibilité est de l'ordre de 5 μg.

4. **Réaction personnelle.** — Nous avons modifié la réaction de Sanchez dans le but de la rendre plus sensible. Nous nous sommes arrêté à la formule suivante :

p-diméthylamino-benzaldéhyde : 1 g.
acide trichloracétique : 2 g.
acide acétique : 80 ml.
acide chlorhydrique : 10 gouttes.
acide sulfurique : 15 gouttes.

La teinte violette est obtenue avec 2 µg d'hétéroside.

B. - LANATA HETEROSIDE C

La digitale laineuse, *Digitalis lanata E.*, contient trois hétérosides initiaux, les lanata hétérosides A, B, et C dont la molécule supporte un radical acétyle. Les deux premiers ne sont que les dérivés acétylés des purpurea hétérosides A et B. Le lanata hétéroside C possède, au point de vue thérapeutique, des avantages non négligeables sur la digitaline cristallisée, ce qui justifie son utilisation en pharmacie (1).

Il donne par hydrolyse fermentaire du glucose et le dérivé acétylé d'un nouvel hétéroside, le digoxoside; comme pour les deux autres, le radical acétyle est fixé, d'après Mohs, à la fraction glucidique représentée, là aussi, par le digitoxose. Dans ces conditions, il n'est pas étonnant que les réactions étudiées soient positives avec cet hétéroside.

C. - OLEANDRINE

Les feuilles de Laurier rose, *Nerium oleander L.*, contiennent plusieurs hétérosides étudiés notamment par Schmiedeberg [35], Leulier [36], Windaus [37] et Tanret [38] ; les deux principaux sont l'oléandroside et le nérioside.

Le premier est depuis peu de temps utilisé en thérapeu-

(1) Cet hétéroside a été spécialisé par les Laboratoires Sandoz sous le nom de Cédilanide.

tique pour ses propriétés cardiotoniques qui présenteraient certains avantages sur les autres drogues similaires; il a été présenté au Congrès international de cardiologie (Paris, 3-7 septembre 1950). A l'hydrolyse, il donne un sucre : l'oléandrose, apparenté au digitoxose (dérivé méthoxylé d'une méthyldésoxypentose), et un génol qui n'est autre qu'un acétylgitoxigénol.

Sa constitution laisse prévoir que les réactions de la digitaline lui sont applicables; c'est ce que l'expérience nous a confirmé. (1, 2).

D. - **OUABAINE**

(Ouabaioside ou G Strophantoside)

Cet hétéroside retiré à la fois des semences de *Strophantus gratus* Franchet, et du bois de l'*Acokanthéra ouabaïo* Cathelineau, s'hydrolyse en une molécule de rhamnose et une molécule d'ouabaïgénol, voisin des génols digitaliques. Il en résulte que les réactions dues aux génols seront positives, au contraire de celles données par le digitoxose ou l'oléandrose.

Notre réaction au p-diméthylamino-benzaldéhyde donne là aussi une coloration violette avec l'hétéroside sur papier chromatographique. le rhamnose provenant de l'hydrolyse donne une tache jaune qui peut servir à le caractériser.

(1) Nous appellerons « Oléandrine » le produit utilisé en pharmacie, le terme oléandroside désignant uniquement l'hétéroside pur.

(2) Cet hétéroside constitue le principe actif du « Nériol » des Laboratoires Nativelle (comprimés à 1/10 mg.; soluté à 1 p. 1.000).

CHAPITRE III

APPLICATION DES REACTIONS ETUDIEES A LA CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

La chromatographie sur papier exige avant tout un réactif ne provoquant aucune altération de la cellulose ; c'est pourquoi, les réactifs de Mc Chesney, Lafon, Binz, Brissemoret-Derrien, Fröhde et Keller (à l'acide sulfurique) qui utilisent l'acide sulfurique concentré, sont à éliminer. Pour les autres réactifs, il faut envisager leur sensibilité; or celle-ci subit des variations importantes lorsque il s'agit de révéler un spot sur un chromatogramme. C'est ainsi que les réactions de Baljet, Legal, Kedde, et Warren ne sont positives que pour un minimum de 100 μg. d'hétéroside.

En définitive, nous ne pouvons retenir que les réactifs de Keller à l'acide chlorhydrique, Arreguine et Pasqualis au xanthydrol, Ulrix à l'acide trichloracétique, Morel et Marthoud au m-dinitrobenzène, Jaminet au tri-chlorure d'antimoine, Svendsen et Jensen par fluorescence, Sanchez et nous-mêmes au p-diméthylamino-benzaldéhyde. Leur sensibilité se trouve résumée dans le tableau suivant (en μg.) :

Keller	Arreguine	Ulrix	Morel	Jaminet	Svendsen	Sanchez	Personnelle
15	5	20	10	15	2	5	2

Dans tous les cas, il suffit de pulvériser le réactif sur le papier chromatographique qui sera éventuellement chauffé; toutefois, dans le cas de l'acide chlorhydrique, une

telle technique a pour conséquence une altération intense du papier ; c'est pourquoi nous avons opéré de la façon suivante : dans une capsule de porcelaine, on fait chauffer 20 à 30 ml d'acide chlorhydrique concentré; on recouvre d'un entonnoir renversé, ce qui évitera les projections de liquide sur le papier et permettra l'obtention d'un jet de vapeurs, dont l'intensité varie avec le degré de chauffage du contenu de la capsule. Dès que l'émission de la vapeur commence, on déplace lentement le chromatogramme au-dessus de l'entonnoir, en le maintenant à quatre ou cinq centimètres de l'extrémité du col; toutes les parties du papier sont ainsi soumises à l'action combinée des vapeurs acides et de la chaleur de la flamme. Les taches apparaissent alors en bleu vert sur fond blanc légèrement jaunâtre; au bout de vingt-quatre heures, elles deviennent uniformément grises.

Nous avons utilisé ces différents réactifs au cours de nos recherches, en donnant cependant la préférence à celui que nous avons mis au point à cause de sa sensibilité et de sa facilité d'exécution. Cependant, pour la rhamnose, provenant de l'hydrolyse de l'ouabaïoside, notre choix s'est porté sur un réactif général des sucres, au phtalate d'aniline, dont il sera question plus loin (cf page 32).

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES SUR LA DIGITALINE OFICINALE ET LE LANATA HETEROSIDE C

DIGITALINE

Les feuilles de digitale pourprée, *Digitalis purpurea L.*, contiennent plusieurs hétérosides dont la connaissance résulte principalement des travaux d'Homolle et Quevenne, Nativelle, Kiliani, Cloetta, Schmiedeberg, Stoll et Kreis. Ce sont :

a) Deux hétérosides initiaux, les purpurea hétérosides A et B, qui sous l'influence d'une diastase (digipurpidase) s'hydrolysent en une molécule de glucose et une molécule d'un hétéroside plus simple.

b) Trois hétérosides simples : digitoxoside, gitoxoside, (provenant de l'hydrolyse des précédents), gitaloside. Ils s'hydrolysent eux-mêmes, sous l'influence des acides étendus à chaud, en un sucre (digitoxose) et en aglucone ou génol (digitoxygénol, gitoxygénol, gitaligénol).

De tous ces hétérosides, seul le digitoxoside est officinal. Il est inscrit à la pharmacopée sous le nom de digitaline cristallisée : c'est la Digitaline Nativelle.

C'est en 1946 qu'Ulrix [49] a pu scinder cette drogue en plusieurs constituants en utilisant la chromatographie sur colonne : une solution de 5 mg. d'hétéroside dans 2 ml. du mélange méthanol (1 volume) - chloroforme (20 volumes), est versée sur une colonne d'alumine; les hétérosides sont

localisés à l'aide des réactifs de Keller et de Kiliani. Ulrix a pu isoler de haut en bas, c'est-à-dire en allant du composé le plus adsorbé à celui qui l'est moins :

une partie d'hétérosides initiaux;
six à sept parties de gitoxoside;
dix parties de digitoxoside;
trois parties de gitoxigénol.

Le schéma suivant rend compte de ces constatations :

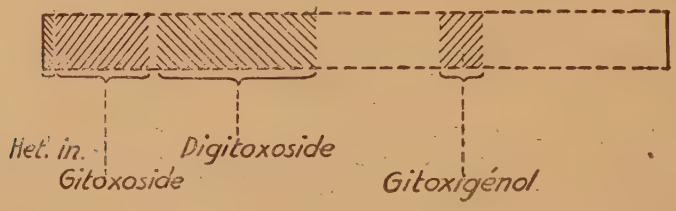


Fig. 1

En 1950, Petit, Pesez, Bellet et Amiard[38] ont cherché par la même méthode à obtenir du digitoxoside pur et ont trouvé que le produit officinal contient 10 pour cent de gitoxoside.

Alors que nous avions publié les premiers résultats de nos travaux[59], Svendsen et Jensen[37] appliquent la méthode de chromatographie sur papier; ils emploient comme solvants des mélanges en proportions variables de chloroforme-méthanol-eau, et ils révèlent les spots grâce à leur fluorescence dans l'ultra-violet en présence d'acide trichloracétique. Ils sont amenés à des conclusions un peu différentes de celles d'Ulrix : ils trouvent comme impuretés du gitoxoside et du gitoxigénol.

Dans ces conditions, nous avons essayé de déterminer la composition qualitative de la digitaline officinale, et de plus, son hydrolyse et les produits qui en résultent furent aussi étudiés.

CHAPITRE PREMIER

ETUDE DE LA DIGITALINE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Nous avons préparé une solution de digitaline officinale à 1 pour cent dans l'alcool à 90°, dont une goutte correspond sensiblement 180 μg. d'hétéroside. Nous avons successivement mis en œuvre la chromatographie à une et à deux dimensions [59].

A. - Chromatographie à une dimension.

Nous sommes parti d'une goutte de la solution de digitaline, et avons utilisé différents solvants d'un usage courant en chromatographie.

1° Les uns nous ont conduit à un seul spot :

a) Rf = 0 :

Eau saturée de butanol,
Eau saturée de phénol,
Alcool amylique.

b) Rf = 1 :

Ethanol-chloroforme ($\overline{aa}$),
Butanol-acide acétique-eau (100-10-50),
Butanol-pyridine-eau (20-5-6),
Pyridine-eau ($\overline{aa}$) (spot étalé),
Phénol saturé d'eau (spot allongé),
Méthanol-eau ($\overline{aa}$) (traînée importante en triangle).

2° Avec d'autres solvants, nous avons pu obtenir deux spots :

a) Certains d'entre eux nous ont donné des résultats peu satisfaisants :

Les solvants : butanol saturé d'eau, éthanol et le mélange éther-acide (20-5) donnent un spot de Rf voisin de 1

très pâle, et un autre de Rf = 1. Le mélange acétate d'éthyle-pyridine-eau $\overline{aa}$ (20-1) fournit un spot de Rf = 0 et un autre de Rf = 0,98 allongé, le pH étant sans influence. Le mélange acétone-eucalyptol ($\overline{aa}$) conduit à un spot de Rf voisin de 0 et à une tache très épaisse s'étendant de 0,55 à 1. Avec le mélange eau saturée de butanol-pyridine-eau ($a\overline{a}$) (25-10), un spot de Rf = 1 est relié par une traînée à un spot de Rf = 0,30. Si l'on augmente la proportion de pyridine, la séparation est moins nette, et tend vers une seule tache. Si on la diminue, le spot de Rf = 0,30 tend vers Rf = 0, la traînée persistant. L'eucalyptol donne un spot de Rf voisin de 0, relié par une traînée à un spot de Rf = 0,60. Enfin, avec le salicylate de méthyle, deux spots, l'un de Rf voisin de 0 et l'autre à 0,89, sont reliés par une mince traînée, le second étant allongé.

b) Nous sommes parvenus à séparer deux spots nets et bien distincts avec les solvants ou mélanges de solvants indiqués par le tableau suivant :

	SOLVANTS	Rf	
1	Acétate d'éthyle 15 Pyridine-eau aa 1 *en présence de quelques cristaux de phénol dans l'enceinte où a lieu l'entraînement.*	voisin de 0	**0,98**
2	Acétate d'éthyle 15 Phénol saturé d'eau 1	id.	**0,97**
3	Acétate d'éthyle 15 Eucalyptol 1	id.	**0,88**
4	Acétate d'éthyle 15 Butanol saturé d'eau 1	id.	**0,98**
5	Chloroforme-méthanol-eau (10-2-5)	id.	**0,97**
6	Butanol-éthanol-eau-ammoniaque (40-10-49-1)	id.	**0,94**

C'est le mélange 3 qui nous a fourni les spots le mieux délimités. (1) Il conduit au chromatogramme représenté par la figure ci-dessous. (Fig. 2).

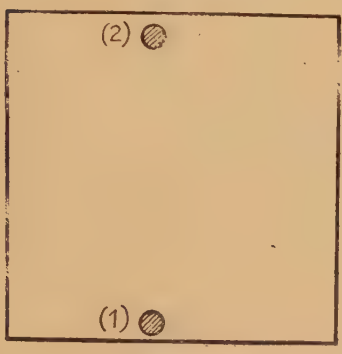


Fig. 2

Nous pouvons donc dire que la digitaline comporte au moins deux composants. Si nous considérons l'intensité de la coloration des spots, nous constatons que le spot de Rf = 1 est le plus coloré, ce qui conduit à le considérer comme dû au digitoxide. Il est possible que le spot de Rf = 0 corresponde au gitoxoside, qui, d'après Ulrix, se rencontre en proportion un peu inférieure. Or, tandis que le digitoxoside est soluble dans dix fois son poids de chloroforme, le gitoxoside est peu soluble dans ce solvant. C'est pourquoi nous avons traité le chromatogramme non révélé par du chloroforme, et, après évaporation du solvant, nous avons révélé les spots. Seule la tache de Rf = 0 persiste : elle est donc insoluble dans le chloroforme qui a dissout la seconde; notre hypothèse semble confirmée.

Dans le but de vérifier si les composants de la digitaline se bornent à deux, nous avons effectué un chromatogramme à deux dimensions.

---

(1) Le solvant 5 a été employé par Svendsen et Jensen (37). Le solvant 6 a été employé par Jones pour la séparation des méthyl pentoses; nous aurons l'occasion d'en reparler, et l'appellerons simplement : solvant de Jones (60).

B. - **Chromatographie à deux dimensions.**

Un chromatogramme obtenu comme il vient d'être indiqué, est soumis à un second entraînement, dans une position perpendiculaire à la première, au moyen d'acétone.

Tandis que le spot N° 2 donne un seul nouveau spot de Rf = 1, le spot N° 1 s'est divisé en deux, en donnant une tache de Rf = 0 (N° 1) et une autre, beaucoup moins intense, de Rf = 1 (N° 3). Si avant de révéler ce second chromatogramme, nous traitons par du chloroforme, les spots N° 1 et 3 persistent seuls.

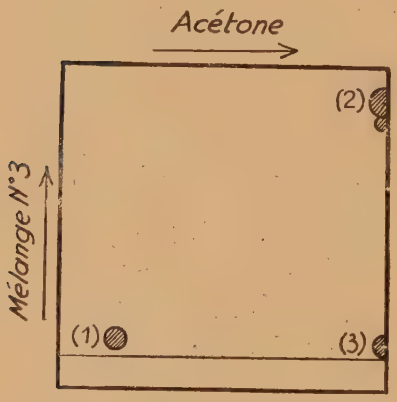


Fig. 3

Fig. 4

Nous pouvons interpréter ces résultats de la façon suivante :

— Le spot N° 2 est uniquement constitué par du digitoxoside, soluble dans le chloroforme.

— Le spot N° 1 représente le gitoxoside, tandis que le spot N° 3 correspondrait aux hétérosides initiaux, comme lui insolubles dans le chloroforme.

Nos résultats sont en accord avec ceux d'Ulrix; cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence le gitoxigénol sans pour cela que nous puissions conclure à son absence. Svendsen et Jensen [37] ont montré que les génols

provenant de l'hydrolyse de la digitaline, possèdent dans les conditions de leurs expériences un Rf très voisin de celui de l'hétéroside correspondant.

digitoxoside : 0,88.
digitoxigénol : 0,92.
gitoxoside : 0,76.
gitoxigénol : 0,82.

Nos recherches sur les génols qui seront exposées ultérieurement, nous ont conduit à des résultats similaires ; il n'est donc pas impossible que notre spot N° 1 représente à la fois le gitoxoside et son génol.

CHAPITRE II

ETUDE DES PRODUITS D'HYDROLYSE DE LA DIGITALINE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

A. - GENOLS.

Nous avons hydrolysé la digitaline suivant le procédé de Windaus et Schwarte [61] : 10 ml. d'une solution de digitaline à 1 pour cent dans l'alcool à 90°, sont additionnés de 10 ml. d'eau distillée, puis de 5 ml. d'acide chlorhydrique 0,13 N; on porte à l'ébullition pendant cinquante-cinq minutes dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant. On neutralise ensuite à la soude puis évapore à sec; on reprend alors le résidu par 5 ml. d'alcool.

Nous avons séparé les génols de cette solution en utilisant une technique mise au point par Kedde [20], basée sur le fait que l'hétéroside et les sucres sont adsorbés par un mélange de chlorure de cuivre II et d'hydroxyde de baryum, tandis que les génols ne sont pas retenus.

Deux à trois grammes d'hydroxyde de baryum en poudre fine sont répartis uniformément dans un tube d'Allihn; on mouille alors la masse avec 1 ml d'alcool absolu puis on fixe le tube à l'aide d'un bouchon de caoutchouc dans le couvercle d'un exsiccateur pouvant être relié à une pompe à vide. On place dans l'exsiccateur un bécher contenant 1,5 ml. d'une solution décinormale d'acide sulfurique dans laquelle sera reçu le filtrat alcalin.

On verse ensuite dans un tube à essais les 5 ml. de solution agluconique et 1 ml. d'une solution de chlorure de cuivre-II dans l'alcool absolu (6,2 g. pour 100 ml.); on agite; on fait alors ruisseler avec précaution le liquide sur les parois du tube d'Allihn en s'aidant d'un agitateur ;

immédiatement après, on fait diffuser la couche supérieure d'hydroxyde de baryum dans le liquide avec une baguette de verre jusqu'à précipitation de la majeure partie du cuivre. On aspire doucement de façon à ce qu'il s'écoule une goutte toutes les deux secondes environ; dès que la surface de la colonne sera privée de solvant, on lave avec de l'alcool absolu, d'abord le tube à essais, puis le tube d'Allihn; on emploie au total 10 ml. d'alcool.

La solution contenant l'aglucone est recueillie, comme nous l'avons dit, dans de l'acide sulfurique; elle est ainsi neutralisée; l'hydroxyde de baryum est précipité, de même que les traces de chlorure de baryum que contient la solution.

Nous obtenons en définitive une solution hydro-alcoolique de génol que nous avons soumis à l'analyse chromatographique à une et à deux dimensions. Nous avons utilisé des mélanges identiques à ceux que nous avons indiqués pour la digitaline elle-même : dans tous les cas, nous avons obtenu des chromatogrammes identiques à ceux de l'hétéroside, avec cette différence bien entendu que le spot correspondant aux hétérosides initiaux a disparu dans l'essai à deux dimensions (fig. 5).

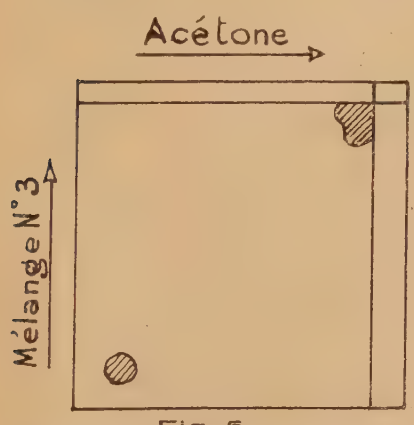


Fig 5

Toutefois, le mélange de Jones [60] nous a conduit à un spot allongé entre 0,8 et 1, alors que, comme nous l'avons vu, la digitaline seule donne, pour Rf = 1, un spot arrondi bien délimité. Il est possible que nous nous trouvions en présence de deux spots, l'un de digitoxigénol et l'autre de gitoxigénol, de Rf très voisins, et par suite réunis l'un à l'autre.

Si l'on admet la présence du seul gitoxigénol dans la digitaline officinale, le spot inférieur apparu lors de l'hydrolyse correspondrait au digitoxygénol; quoi qu'il en soit, ces faits ne nous apportent aucune certitude sur la composition de la drogue.

B. - DIGITOXOSE.

1° Etude du digitoxose pur.

Nous avons déterminé le Rf du digitoxose à partir d'une solution aqueuse de ce sucre à 1 pour cent. Nous avons d'abord tenté de révéler les spots par un réactif au phtalate d'aniline utilisé par Partridge pour différents sucres; sa composition est la suivante :

aniline : 0,93 g.
acide phtalique : 1,66 g.
butanol : 100 ml.

Une fois la montée du solvant effectuée, le papier est séché, et on pulvérise le révélateur. On porte alors le papier à une température de 100-105° pendant deux à trois minutes; la coloration observée est différente selon la nature du sucre. Pour le digitoxose, ce réactif nous a paru peu sensible, la réaction n'étant perceptible que pour au moins 500 μg. ; nous nous sommes, là encore, adressé à notre réactif au p-diméthylamino-benzaldéhyde. Voici les résultats que nous avons obtenus :

1. Butanol-acide acétique-eau (20-5-25) 0,73
2. Butanol-éthanol-eau-ammoniaque (40-10-49-1) .. 0,65
3. Butanol-méthanol-cyanure potassium 10 p. 100 (10-2-X) 0,63
4. Acétate d'éthyle-eau-acide acétique (12-12-4) ... 0,72
5. Acétate d'éthyle-pyridine-eau (15-10-40) 1,
6. Phénol saturé d'eau 1,
7. Phénol saturé d'eau-cyanure de potassium 1 p. 10 (10-1) 0,84
8. Méthanol 0,83

9. Benzène-acide acétique cyanure potassium 1 p. 40 (10-2-0,5) 0,04
10. Benzène-(méthanol-acide trichloracétique 15-1) (8-2) 0,16
11. Benzène-(méthanol-acide benzoïque 15-0,1) (8-2) 0,06

2° Caractérisation du digitoxose dans les produits d'hydrolyse de la digitaline.

a) Nous avons d'abord étudié la digitaline hydrolysée suivant la méthode de Windaus et Schwarte [61] déjà décrite (cf. page 30); le résidu d'évaporation obtenu est traité, dans une ampoule à décantation, par un mélange de 20 ml. de chloroforme et de 10 ml. d'eau; les génols passent dans le chloroforme, tandis que le digitoxose se dissout dans l'eau. Cette solution aqueuse a été soumise alors à une analyse chromatographique dont les résultats furent loin de correspondre à ceux que nous attendions : nous n'avons pas pu mettre en évidence de digitoxose; par contre, voici ce que nous avons pu constater :

— l'action du phtalate d'aniline fait apparaître trois spots très rapprochés, dont l'un, le plus entraîné, est intensément coloré, ce qui est incompatible avec la sensibilité du réactif vis-à-vis du digitoxose. (fig. 6)

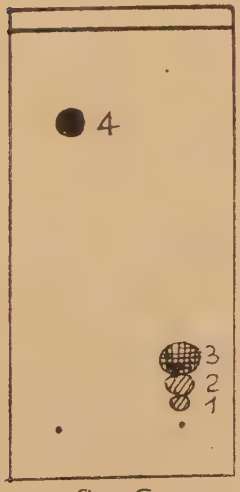


fig. 6

— le réactif au p-diméthylaminobenzoldéhyde colore les spots en jaune et non en violet.

— Le Rf des spots est tout à fait différent de celui du sucre.

Solvants	RF	
	Spot 3	Digitoxose
1	0.14	0,73
6	0,26	1
11	0	0,06

— nous nous sommes aperçu que le spot le plus intense apparaît par chauffage, même en l'absence de phtalate d'aniline qui n'a donc joué aucun rôle dans son apparition; il s'agit d'un composé organique noircissant sous l'influence de la température.

Le digitoxose a donc été détruit au cours de cette hydrolyse; d'ailleurs si l'on soumet le sucre pur au traitement précédemment décrit, on obtient le même chromatogramme avec les trois spots, tandis que le digitoxose n'est plus révélable.

Par analogie avec ce qui se passe pour les pentoses, il est possible que nous nous trouvions en présence de furfural ou de ses dérivés. Nous avons donc utilisé un réactif classique et très sensible de ces composés permettant de les caractériser, en l'adaptant à la chromatographie par une légère modification de sa formule :

aniline	0,10 g.
acide acétique	50

On pulvérise sur le chromatogramme et après un léger chauffage, on obtient une coloration rouge fugace avec les spots 1 et 2, qui fait bientôt place à une teinte jaune brun. On peut donc considérer ces deux spots comme des dérivés furfuraliques.

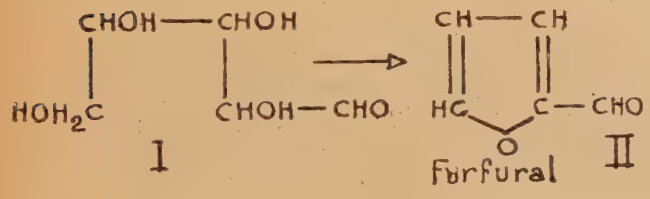
D'autre part, nous avons préparé le l'$_{\omega}$-hydroxyméthyl furfural, en chauffant du lévulose avec de l'acide chlorhydrique dilué. Il possède le même Rf que le spot n° 1; peut-être nous trouvons-nous en présence de ce dérivé.

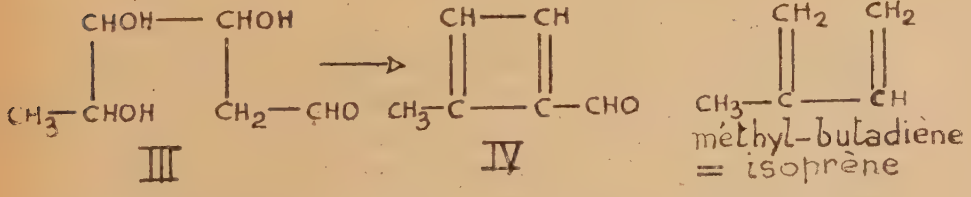
Quant au spot N° 3, le plus important, qui représente le principal produit de la réaction, nous devons nous borner à émettre des hypothèses, n'ayant pas à notre disposition une quantité suffisante de digitoxose.

Le liquide d'hydrolyse ne réduit pas le réactif de Tollens, ce qui indique la disparition de la fonction aldéhydique (les dérivés du furfural se trouvent en quantité très faible

comme nous l'avons indiqué) ; il ne donne pas les réactions des cétones (Legal, Nessler) ; enfin il décolore à froid une solution diluée de permanganate de potassium, ce qui conduit à admettre l'existence d'un composé non saturé. Enfin, si l'on ajoute quelques ml. d'acide sulfurique concentré, on perçoit rapidement une odeur rappelant celle du caoutchouc chauffé ; il n'est pas impossible qu'il se soit formé un composé de la série du butadiène à laquelle appartient l'isoprène.

Si nous admettons qu'un méthyl-désoxypentose (III) se comporte en présence d'acide chlorhydrique à chaud (nous avons effectué l'hydrolyse dans ces conditions) de la même façon qu'en pentose (I), nous pouvons écrire les réactions suivantes :





Il se serait ainsi formé un aldéhyde correspondant au méthylcyclobutadiène (IV), ce qui n'est pas conforme à la réalité, puisque nous avons noté l'absence de propriétés réductrices (d'ailleurs, le cyclobutadiène, très instable, n'a jamais pu être isolé), mais il a pu prendre naissance un composé voisin. Quoi qu'il en soit, il est facile, par le simple examen des formules, de mettre en évidence les rapports étroits qu'il présenterait avec l'isoprène.

Il ne s'agit là — nous insistons sur ce point — que de faits pour lesquels nous n'apportons aucune preuve suffisante, mais qui concordent avec les expériences qu'il nous a été possible d'effectuer.

b) Dans de telles conditions, nous avons essayé d'hydrolyser la digitaline en évitant l'altération du digitoxose. Nous avons d'abord remplacé l'acide chlorhydrique par de l'acide acétique ; les résultats restent inchangés. Nous avons ensuite diminué la quantité d'acide. Nous avons traité 10 ml. de solution de digitaline à 1 pour cent par 8 ml. d'eau distillée et une goutte d'acide chlorhydrique à 1 pour mille ; nous avons porté à ébullition cinq minutes : nous avons ainsi pu mettre en évidence par chromatographie, le digitoxose, mais accompagné de ses produits de dégradation.

A froid, en présence d'un acide même en très faible proportion, le digitoxose peut être révélé sous forme de traces, mais une petite quantité de ce que nous avons considéré comme de l' ω-hydroxy méthyl furfural, prend aussi naissance.

Nous sommes parvenu à obtenir le sucre seul par chauffage en milieu neutre : 5 ml. de solution de digitaline à 1 pour cent dans de l'alcool à 50°, sont portés à ébullition pendant dix minutes. On concentre au bain-marie 1,5 ml. environ; on lave avec 10 ml. de chloroforme pur pour éliminer les génols : on obtient ainsi une solution de digitoxose qui nous a fourni un chromatogramme identique à celui du sucre pur.

Il résulte, en définitive, que le digitoxose est susceptible d'être altéré par les acides dilués à chaud et même à froid; si l'on veut obtenir ce sucre intact par hydrolyse de ses hétérosides, il suffit de chauffer leur solution en l'absence d'acide.

CHAPITRE III

RECHERCHE DES SAPONOSIDES DANS LA DIGITALINE OFFICINALE

On sait que dans les feuilles de digitale, il existe des saponosides à côté des hétérosides; nous nous sommes demandé si ces derniers accompagnent le digitoxoside dans la digitaline officinale en plus des hétérosides et génols qui y ont été signalés.

Préparation de la solution.

Nous avons traité 0,10 g. de digitaline par 30 ml. d'eau distillée en trois fois; après agitation, nous avons filtré, puis lavé filtre et tube avec 10 ml. d'eau distillée. Le résidu d'évaporation au bain-marie est repris par 20 ml. d'un mélange d'un volume de méthanol et de cent volumes de chloroforme, pour éliminer les traces d'hétérosides, en chauffant légèrement. Après agitation, nous avons centrifugé, décanté le liquide clair ainsi obtenu. Ce traitement est recommencé deux fois avec 20 ml. de chloroforme pur. Le précipité est repris par 15 ml. d'eau distillée; on obtient ainsi une solution aqueuse de saponosides, s'il y en a.

Le résidu retenu par filtration, après traitement à l'eau distillée est constitué par la digitaline privée de saponosides; nous l'avons dissous dans 20 ml. d'alcool. Cette solution est ajoutée aux solvants qui ont servi à purifier le résidu d'évaporation des saponosides. Nous avons alors ajouté 5 ml. d'une solution de cholestérol à 0,1 pour cent dans l'éther. Après repos de trente minutes nous avons filtré. Le but de cette opération est de précipiter les traces de saponosides qui pourraient subsister. Nous avons alors

concentré à 3 ou 4 ml., puis ajouté de l'alcool pour obtenir 5 ml. de liquide : c'est une solution de digitaline sans saponosides à environ 2 pour cent.

Caractérisation des saponosides

Sur la solution aqueuse obtenue, on pratique les réactions générales des saponosides :

a) Coloration : si on ajoute au résidu d'évaporation de l'acide sulfurique concentré, on obtient une coloration jaune qui passe rapidement au rose puis au violacé.

b) Mousse : la solution mousse par agitation et la mousse persiste pendant deux à trois minutes.

c) Précipitation par le cholestérol : on mélange quelques ml. de solution et une solution de cholestérol à 1 pour cent dans l'alcool 95° ; on obtient un louche.

d) Hémolyse : 10 ml. de solution sont évaporés et le résidu est dissous dans 5 ml. de soluté isotonique de chlorure de sodium. Nous avons versé dans une série de tubes à essais 1 ml. des solutions suivantes :

1. - Solution de saponosides dans le soluté isotonique.
2. - Solution de saponine du commerce à 1 pour mille dans le soluté isotonique.
3. - Mélange de 5 ml. de solution de digitaline privée de saponosides et de 10 ml. de soluté isotonique.
4. - Mélange de 5 ml. d'alcool à 95° et de 10 ml. de soluté isotonique.

Dans chacun de ces tubes, on verse 1 ml. d'une suspension de globules rouges dans un soluté isotonique. Voici les résultats obtenus en fonction du temps :

+ = hémolyse

— = pas d'hémolyse

1	2	3	4	
+	+	—	—	3 heures
+	+	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	20 heures

Dans une seconde série d'expériences, nous avons imprégné une petite bande de papier filtre de chacune de ces solutions et les avons déposées à la surface d'une gélatine au sang. Les résultats sont identiques. Par conséquent, notre solution possède bien des propriétés hémolytiques; l'hémolyse obtenue au bout de vingt heures dans le tube 3 semble due à la présence de l'alcool, puisque on l'observe aussi dans le tube 4.

Ces résultats conduisent à admettre la présence d'une nouvelle impureté dans la digitaline officinale.

LANATA-HETEROSIDE C

La chromatographie directe nous montre que le lanata-hétéroside C utilisé en pharmacie est accompagné de traces d'impureté qui sont peut-être les lanata-hétérosides A et B.

Voici un chromatogramme à deux dimensions obtenu avec les mêmes solvants que pour la digitaline.

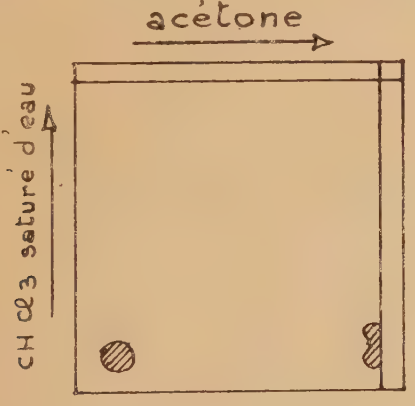


fig. 7

Il n'est pas possible d'isoler le sucre sans l'altérer, même par chauffage en absence d'acide; on obtient seulement les spots correspondant à la dégradation du digitoxose, sans doute par suite de la libération d'acide acétique.

TROISIEME PARTIE

RECHERCHES SUR L'OLEANDRINE ET L'OUABAINE

CHAPITRE PREMIER

OLEANDRINE

I. - ETUDE DE L'OLEANDRINE

Nous avons utilisé la chromatographie ascendante à une et à deux dimensions; les spots sont révélés par notre réactif au p-diméthylamino-benzaldéhyde [62].

Chromatographie à une dimension

Le solvant employé est du chloroforme saturé d'eau ; on obtient ainsi une séparation en deux spots : l'un de Rf = 0 ; l'autre de Rf proche de 1. (Fig. 8).

Le produit étudié contient donc au moins deux composants ; le spot N° 2 qui présente la coloration la plus intense doit être logiquement considéré comme de l'oléandroside ; d'ailleurs la différence de solubilité de l'oléandroside et du nérioside dans certains solvants permet de confirmer cette hypothèse : si l'on traite le chromatogramme non révélé par du chloroforme ou par de l'éther, le spot N° 2 disparaît, ce qui est en accord avec les caractères de solubilité de l'oléandroside. Quant au spot N° 1, il

peut être considéré, toujours d'après les caractères de solubilité, comme du nérioside.

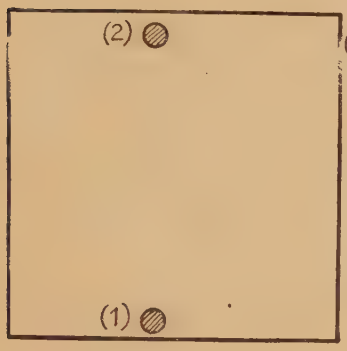


Fig. 8

	Solubilités		
	Eau	Chloroforme	Éther
Oléandroside	insoluble	soluble	soluble
Nérioside	soluble	insoluble	insoluble

Comme pour la digitaline, nous avons complété cette étude par la chromatographie à deux dimensions.

Chromatographie à deux dimensions

Le premier solvant est toujours du chloroforme saturé d'eau, le second de l'acétone. Le spot de Rf = 0 dans l'essai précédent se partage en deux. Le chromatogramme obtenu est donc identique à celui que fournit la digitaline officinale dans les mêmes conditions. Les trois spots peuvent logiquement faire supposer la présence, dans l'oléandroside, d'hétérosides initiaux, que J.-R. Cortesi [63] estime vraisemblable.

Essai de fractionnement de l'oléandroside par différents solvants

L'étude chromatographique a été complétée par les expériences suivantes :

a) La solution alcoolique d'oléandrine est évaporée à sec; le résidu est repris par 3 ml. de chloroforme; on

ajoute au filtrat le chloroforme de lavage du filtre (1,5 ml.) on obtient la solution 1.

La partie insoluble dans le chloroforme et restée sur le filtre est traitée par 5 ml. d'acétone. Cette solution porte le numéro 2.

Il reste encore sur le filtre des traces d'un corps insoluble dans un petit excès d'acétone (10 ml.), mais que l'on solubilise dans 3 ml. d'alcool à 90°, ce qui nous donne la solution 3.

Ces trois solutions sont évaporées et les résidus correspondants traités par 0,5 ml. d'acide sulfurique concentré. Nous avons obtenu les colorations suivantes :

1. Rouge brun passant au rose lilas au bout de deux heures.
2. Jaune brun.
3. Rose lilas.

D'après ce que nous avons dit plus haut, nous pouvons considérer que la fraction 1 est constituée par de l'oléandroside (soluble dans le chloroforme), la fraction 3 par du nérioside (insoluble dans ce solvant). Quant à la fraction 2, elle représente sans doute un autre hétéroside.

De plus la fraction 1 semble de composition complexe; si on la fait cristalliser à plusieurs reprises dans de l'alcool à 50°, on sépare en définitive une partie cristallisée et une amorphe; un des cristaux, en forme de pinceau, est traité par une goutte d'acide sulfurique : le cristal devient brun ; après dissolution, la goutte prend une teinte rose brun, puis au bout d'une heure environ, rose violacé. La partie non cristallisée traitée de la même manière, donne une coloration jaunâtre qui rapidement devient lilas. Cependant, la chromatographie n'a pu nous donner aucune réponse; les essais de séparation avec de très nombreux solvants ou mélanges de solvants nous ont toujours conduit à des résultats négatifs.

II. - ETUDE DES PRODUITS D'HYDROLYSE

A. - Génols.

L'hydrolyse a été conduite suivant la technique de Windaus et Schwarte [61]. La solution alcoolique obtenue a été soumise à l'analyse chromatographique à une et à deux dimensions, comme dans le cas de la digitaline; nous avons obtenu deux spots identiques à ceux qui viennent d'être signalés; il ne semble pas possible, là non plus, de séparer hétérosides et génols.

B. - Oléandrose.

1° *Etude de l'oléandrose pur :* Jones [60] a déterminé le Rf de ce sucre en utilisant le mélange solvant dont nous rappelons la formule : butanol-éthanol-eau-ammoniaque (40-10-49-1); il est égal à 0,88. Nous avons complété cette étude par l'emploi des mélanges solvants indiqués pour le digitoxose :

Solvants	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Rf	0,89	0,88	0,78	0,89	1	1	0,92	0,22	0,27	0,36	0,27

2° *Caractérisation de l'oléandrose dans les produits d'hydrolyse de l'oléandrine* : L'oléandrine hydrolysée par la méthode de Windaus et Schwarte [61] a été traitée comme il a été indiqué au sujet de la digitaline; la chromatographie sur papier nous a conduit à des résultats identiques à ceux que nous avons signalés pour le digitoxose; ce qui prouve que l'oléandrose est aussi détruit au cours de l'hydrolyse.

Nous avons cependant pu obtenir le sucre non altéré par chauffage en l'absence d'acide.

CHAPITRE II.

OUABAINE

L'analyse chromatographique directe indique qu'il s'agit d'un hétéroside pur; quel que soit le solvant employé, l'ouabaïoside est très peu entraîné, ce qui est en accord avec les conclusions de Jaminet [11]; le Rf reste voisin de 0.

L'hydrolyse est beaucoup plus difficilement réalisable que pour les autres hétérosides; à chaud, en l'absence d'acide, il reste intact. Il faut avoir recours à la technique suivante : 10 ml. de solution d'ouabaïne à 1 p. cent dans l'eau, sont portés à ébullition pendant dix minutes en présence de X gouttes d'acide sulfurique à 2 p. cent. Le liquide est alors neutralisé, on filtre et on ajoute les eaux de lavage du filtre; on évapore à sec au bain-marie. Le résidu est repris par 5 ml. de pyridine qui ne dissout que les sucres; on évapore à nouveau à sec et dissout finalement le résidu dans 1 ml. d'eau distillée.

On procède à la chromatographie sur papier : avec le solvant de Jones, le Rf est bien celui du rhamnose. Avec le solvant que nous avons employé (N° 11) pour le digitoxose et l'oléandrose, le sucre n'est pas entraîné.

QUATRIEME PARTIE

ESSAIS DES PREPARATIONS GALENIQUES DE QUELQUES HETEROSIDES CARDIOTONIQUES

Nous avons essayé d'appliquer les méthodes qui viennent d'être décrites à l'essai qualitatif de quelques médicaments à base des hétérosides cardiotoniques étudiés.

La digitaline et l'oléandrine sont employés sous forme de granules, de solutés (officinaux pour la première seulement), et de comprimés, le lanata-hétéroside C sous forme de soluté buvable et de soluté injectable, l'ouabaïne sous forme de granules et de soluté.

Il nous a été possible d'identifier chaque hétéroside et par suite de différencier ces divers médicaments, exception faite pour les solutés injectables qui contiennent une trop faible quantité de principe actif.

Le Codex indique pour le soluté de digitaline, une réaction à l'acide chlorhydrique : on évapore 5 ml. de soluté au bain-marie bouillant; on reprend par 10 ml. de chloroforme et enfin, on évapore à sec dans une capsule. L'addition de quelques gouttes d'acide chlorhydrique fait apparaître une coloration verte. Cette réaction n'est pas spécifique, puisque positive également avec l'oléandroside et la lanata-hétéroside C. L'analyse chromatographique directe ne peut donner de résultats satisfaisants, les Rf des différents hétérosides étant très voisins les uns des autres; par contre, le sucre peut être aisément caractérisé dans chaque cas.

CHAPITRE PREMIER

DIGITALINE ET LANATA-HETEROSIDE C

DIGITALINE

A. - Extraction.

1° Les granules et comprimés sont d'abord pulvérisés, puis épuisés par 10 ml. de chloroforme à chaud. On entraîne ainsi un peu de colorant qui ne gène pratiquement pas par la suite.

2° Pour le soluté à 1 p. mille, l'essai ne peut se faire directement par suite de la présence du glycérol qui est un obstacle à une chromatographie correcte. Sanchez [44] l'élimine de la manière suivante : 10 gouttes de solution sont diluées par 5 ml. d'eau distillée; après dissolution de 0,50 g. de borate de sodium, on verse dans un tube contenant 5 ml. de chloroforme. On agite cinq minutes et on reçoit la couche chloroformique qui contient l'hétéroside sur du sulfate de sodium anhydre. Après filtration, on évapore à sec au bain-marie. Cette méthode ne solubilise pas la totalité de la digitaline. C'est pourquoi nous avons mis au point un procédé qui présente l'avantage d'extraire intégralement l'hétéroside et d'éviter son altération.

Dans une fiole d'Erlenmeyer pouvant être reliée à une pompe à vide, on verse 2 ml. de solution de digitaline, puis 10 gouttes d'éther pour abaisser le point d'ébullition de l'alcool; on met en communication avec la pompe à vide; au bout d'une heure à une heure un quart environ, l'alcool est évaporé et la solution a pris un aspect opales-

cent, dû à l'insolubilisation de l'hétéroside dans un milieu progressivement appauvri en alcool, puis uniquement glycéro-aqueux. On peut d'ailleurs accélérer l'évaporation de l'alcool en ajoutant toutes les cinq minutes quelques gouttes d'éther jusqu'à ce qu'une de ces gouttes ne se dissolve plus; ce qui, avec le louchissement progressif, est un signe certain de la disparition de l'alcool; dans ces conditions, on peut opérer en moins de trois-quarts d'heure. On verse alors 10 ml. d'eau distillée; on laisse en contact cinq minutes, puis on centrifuge. Le culot de centrifugation est lavé par 10 ml. d'eau distillée à deux reprises, puis centrifugé à nouveau. On recueille ainsi la presque totalité de l'hétéroside.

Cependant, le liquide aqueux en contient quelques traces; on l'agite avec trois grammes d'alumine pure pendant une à deux minutes; après deux minutes de contact on centrifuge; on décante le liquide surnageant le précipité, que l'on lave par 10 ml. d'eau distillée avant une nouvelle centrifugation. On recommence une nouvelle fois ce traitement; on essore le plus possible l'alumine qui a absorbé le reste d'hétéroside dissous dans l'eau, puis on élue avec 5 ml. d'alcool à 95° et ensuite avec 10 ml. de chloroforme. Cette solution servira à dissoudre le résidu hétérosidique obtenu au cours de la première opération. On évapore sous pression réduite.

B. - **Contrôles.**

Nous nous sommes assuré que ce mode opératoire permet une extraction totale de l'hétéroside et évite son hydrolyse; le résidu hétérosidique est solubilisé dans 2 ml d'alcool (nous sommes parti de 2 ml. de soluté), et soumis aux contrôles suivants :

1° Contrôle de l'extraction : on mélange cinq gouttes de solution à un ml. du réactif de Morel et Marthoud au

m-dinitrobenzène, puis on ajoute cinq gouttes d'hydroxyde de sodium à 20 p. cent; la coloration obtenue est comparée avec celle fournie par cinq gouttes de solution témoin à 1 p. mille de digitaline officinale : les deux colorations sont exactement identiques; il n'y a donc pas de pertes au cours de la récupération; mais l'altération reste possible (1).

2° Contrôle de la pureté : on dépose sur une feuille de papier chromatographique une goutte de solution-1, une goutte de soluté alcoolique à 1 p. mille-2 et une goutte de solution de digitoxose-3, Le solvant employé est un mélange butanol-acide acétique-eau (20-5-25), le révélateur, notre réactif au p-diméthylamino-benzaldéhyde. Le chromatogramme révèle l'absence de digitoxose; il n'y a donc pas eu hydrolyse. Par contre, si au lieu d'opérer sous pression réduite, on effectue l'évaporation de l'alcool et du mélange chloroforme-alcool au bain-marie, le digitoxose est alors décelable-4, ce qui indique bien que l'hétéroside a été hydrolysé dans ces conditions. (Fig. 9).

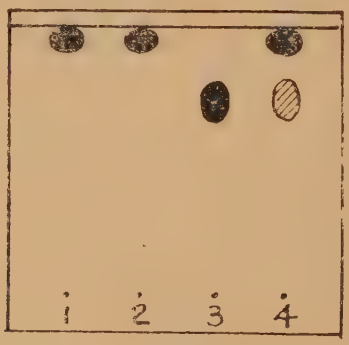


Fig. 9

(1) Si l'on n'a pas de digitaline à sa disposition pour préparer la solution témoin, on peut utiliser le mélange suivant : 1 ml. de solution A*, 3 gouttes de solution B, et 0,25 ml. d'eau. La coloration est identique à celle fournie par une solution de digitaline à 1 p. 1.000. Cette technique permet aussi de contrôler le titre du soluté essayé.

*Solution A : sulfate de cuivre ammoniacal; 6 g.; acide acétique : 2 ml.; nitrate de cobalt : 3,6 g.; et eau qsp. 100 ml.

Solution B : nitrate de cobalt : 5 g.; acide acétique : 2 ml.; et eau qsp. 100 ml.

3° Contrôle de l'absence de glycérol : un lavage peu poussé, soit du résidu hétérosidique, soit de l'alumine après adsorption, peut entraîner la présence de glycérol dans la solution finale. On peut en mettre très facilement en évidence, même de faibles traces, en déposant une goutte de la solution obtenue sur un papier chromatographique, et en pulvérisant notre réactif au p-diméthylamino-benzaldéhyde ; une teinte verte plus ou moins intense se développera par chauffage et s'estompera peu à peu au cours du refroidissement du papier ; elle réapparaîtra si on reporte ce dernier au-dessus d'une flamme. Dans le cas présent aucune coloration n'a été observée.

Dans ces conditions, la solution de digitaline obtenue, nous permettra, après hydrolyse, de caractériser le digitoxose par chromatographie.

LANATA-HETEROSIDE C

L'extraction de l'hétéroside à partir du soluté se fait de la même façon que dans le cas de la digitaline.

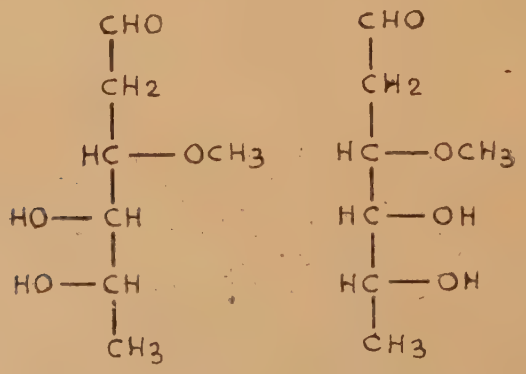
CHAPITRE II

OLEANDRINE ET OUABAINE

OLEANDRINE

La technique d'extraction est la même que celle de la digitaline pour les granules et les comprimés d'une part, et le soluté d'autre part.

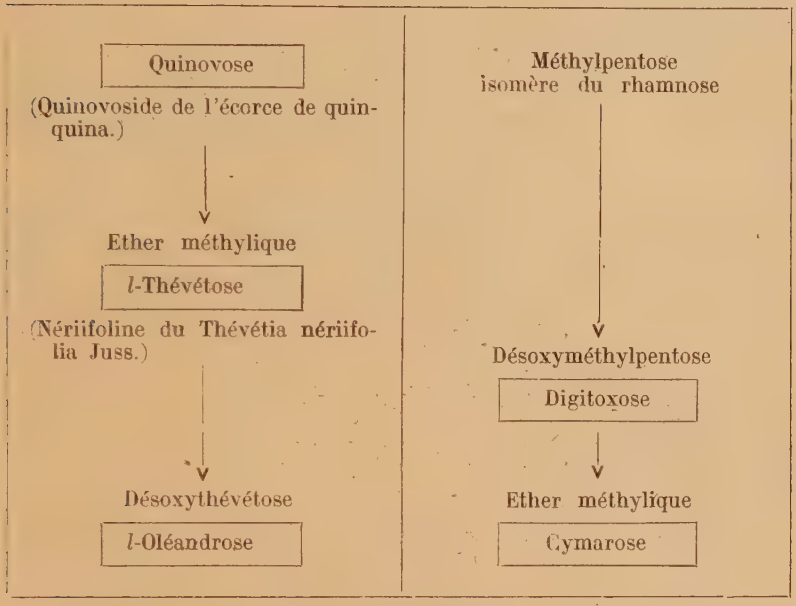
Le Rf de l'oléandrose est facilement vérifié, mais il n'est spécifique que dans des conditions bien précises. Jones a, en effet, montré que le cymarose, provenant de l'hydrolyse du K-Strophantoside du *Strophantus Kombe* Oliver possède, dans les conditions où il a opéré, le même Rf ; ce qui n'est guère surprenant si l'on songe que les deux sucres sont isomères :



oléandrose cymarose

Le tableau suivant rend compte de la parenté chimique

entre ces deux sucres d'une part et le digitoxose d'autre part :



Nous avons donc déterminé le Rf du cymarose dans les différents solvants utilisés au cours de ce travail et les avons comparés avec ceux de l'oléandrose :

Solvants		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Rf	Cymarose	0,87	0,88	0,78	0,90	1	1	0,92	0,92	0,32	0,54	0,45
	Oleandrose	0,89	0,89	0,78	0,90	1	1	0,92	0,92	0,22	0,36	0,27

Nous voyons donc que seuls deux mélanges permettent une séparation correcte des deux sucres. Avec le solvant N° 10, les spots obtenus sont légèrement étirés ; toutefois, en arrêtant la montée du solvant à une hauteur convenable, on obtient des taches bien délimitées. Le deuxième mélange (N° 11) donne des spots normaux quelle que soit la montée du solvant.

La température doit être maintenue à + 18°, la moindre variation amenant un phénomène de démixion qui modifie sensiblement les Rf.

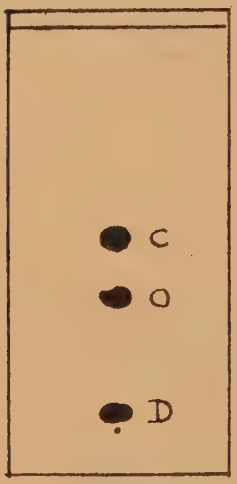


Fig 10

En opérant de la sorte, on peut caractériser d'une façon certaine l'oléandrose, et par suite l'oléandroside, dans les préparations galéniques.

Voici un chromatogramme obtenu à partir d'une solution des trois sucres : digitoxose, oléandrose, cymarose, avec le solvant N° 11. (Fig. 10).

OUABAINE

On traite vingt granules ou comprimés par 20 ml. d'alcool à 50° ; on évapore sous pression réduite à environ 2 ml. puis on centrifuge. La solution est alors soumise aux opérations suivantes qui sont également valables pour le soluté d'ouabaïne.

On évapore comme précédemment sous pression réduite, l'alcool contenu dans 1 ml. de solution à 1 pour cent. On ajoute 10 ml. d'acétone et 5 ml. d'éther: il se produit alors une légère précipitation d'hétéroside. On centrifuge, lave le précipité par 5 ml. d'alcool absolu que l'on recueille ; on ajoute 10 ml. d'acétone et de l'éther jusqu'à louche très léger ; la solution est alors agitée avec quatre grammes d'alumine pendant deux à trois minutes et centrifuge,

Le précipité est rapidement lavé avec un mélange de quatre parties d'éther et dix parties d'acétone. On élue avec un solvant composé de trois parties d'alcool à 95° et une partie de pyridine. Cette solution servira à dissoudre le précipité d'hétéroside déjà obtenu, après quoi on évapore à sec sous pression réduite.

L'hydrolyse est conduite comme il a été indiqué, et le rhamnose peut alors être caractérisé.

CHAPITRE III

DIAGNOSE D'UN MEDICAMENT CARDIOTONIQUE HETEROSIDIQUE

Il est possible d'appliquer les notions qui viennent d'être exposées à l'identification d'un médicament cardiotonique hétérosidique.

I. Médicaments à base d'un seul hétéroside.

a) *Solutés médicamenteux :*

2 ml. de soluté sont évaporés sous pression réduite jusqu'à départ de l'alcool :

Premier cas : Il se forme un précipité :

Il peut être constitué par de la digitaline, du lanata-hétéroside C ou de l'oléandrine; ce précipité est hydrolysé en l'absence d'acide suivant la technique indiquée p. 36. On procède alors à l'analyse chromatographique avec le solvant N° 11; les spots sont révélés avec notre réactif :

a) Présence de digitoxose : digitaline.

b) Présence d'oléandrose : oléandrine (Nériol).

c) Présence de produits de dégradation (non entraînés) : lanata-hétéroside C.

Deuxième cas : Il ne se forme pas de précipité :

On recherche alors l'ouabaïne comme il a été indiqué (p. 52) ; une goutte de solution aqueuse finalement obtenue (p. 44) est déposée sur une feuille de papier chromatographique et traitée par notre réactif ; s'il apparaît une coloration violette, on vérifiera la présence d'ouabaïne par caractérisation du rhamnose après hydrolyse acide.

b) *Granules et comprimés :*

— Les granules ou comprimés sont d'abord épuisés par du chloroforme qui s'empare de la digitaline ou de l'oléandrine ; une goutte de la solution chloroformique est déposée sur une feuille de papier chromatographique et traitée par notre réactif :

1° Il apparaît une coloration violette : présence d'un hétéroside qui sera caractérisé par son sucre (obtenu par hydrolyse en milieu neutre).

2° Il n'apparait pas de coloration : absence d'hétéroside. Dans ce cas, le résidu de l'extraction chloroformique est traité par de l'alcool à 50° en vue de la recherche de l'oubaïne.

II. Médicaments à base d'un mélange d'hétérosides.

La méthode est applicable aux solutés cardiotoniques constitués par un mélange d'hétérosides (digitaline-ouabaïne, par exemple). On évapore 2 ml. sous pression réduite jusqu'à disparition de l'alcool ; le précipité contient les hétérosides du premier groupe (digitaline dans l'exemple); il est séparé par centrifugation; l'ouabaïne reste dissoute dans le liquide surnageant.

CONCLUSION

Les recherches que nous avons entreprises nous ont permis, grâce à la chromatographie sur papier, d'acquérir des connaissances nouvelles sur la composition et les réactions d'identité de la digitaline officinale et de quelques autres hétérosides cardiotoniques, ainsi que sur leurs produits d'hydrolyse ; grâce à elles nous avons pu mettre au point une méthode de diagnose de certaines de leurs préparations galéniques.

I. - Notre but étant d'appliquer la chromatographie sur papier à l'étude de quelques hétérosides cardiotoniques, nous avons d'abord exposé le principe et la technique de la méthode, après un bref rappel de la chromatographie sur colonne.

II. - Dans le but de révéler les spots d'hétérosides, nous avons cherché un réactif suffisamment sensible et pouvant être mis, sans inconvénient, au contact du papier. Nous avons passé en revue les réactions classiques de la digitaline officinale; nous avons précisé la sensibilité de chacune d'elles, et avons déterminé à quelle fraction de la molécule elles doivent être attribuées : génol ou sucre. Nous avons amélioré certaines techniques.

Nous avons mis au point une nouvelle réaction au p-diméthylamino-benzaldéhyde qui nous a paru présenter un avantage indiscutable et que nous avons par la suite employée couramment au cours de notre travail.

III. - L'étude chromatographique sur papier, nous a permis de mettre en évidence, dans la digitaline, officinale du digitoxoside, du gitoxoside et des hétérosides initiaux. Il ne nous a pas été possible de caractériser le gitoxigénol signalé par Ulrix ; toutefois, nous ne pouvons pas conclure

à son absence, car l'étude ultérieure des génols à montré qu'ils ne sont pas séparables des hétérosides, du moins dans les conditions où nous avons opéré.

De plus l'application à la digitaline officinale des réactions des saponosides nous amène à envisager leur présence dans la drogue.

IV. - Nous avons déterminé le Rf du digitoxose dans différents solvants; en recherchant ce sucre dans les produits d'hydrolyse acide de la digitaline, nous avons observé la formation de composés de dégradation que nous avons tenté d'identifier. Si deux d'entre eux semblent être des dérivés furfuraliques, nous devons, pour le troisième, nous borner à émettre une hypothèse. Pour obtenir du digitoxose pur, il faut effectuer l'hydrolyse par simple chauffage en l'absence d'acide.

V. - Le lanata-hétéroside C semble plus pur que la digitaline; nous n'avons pu mettre en évidence que des traces d'impureté, peut-être des Lanata-hétérosides A et B. Il est impossible d'obtenir du digitoxose par hydrolyse, ce sucre étant toujours dégradé, même en l'absence d'acide.

VI. - L'oléandrine est elle aussi un mélange : l'hétéroside principal, l'oléandroside, est accompagné de nérioside et peut-être d'hétérosides initiaux.

Le *l*-oléandrose subit au cours de l'hydrolyse acide une altération analogue à celle du digitoxose; il ne peut être obtenu que dans les mêmes conditions que ce dernier.

VII. - Quant à l'ouabaïne, elle semble constituée uniquement par de l'ouabaïoside.

L'hydrolyse acide conduit normalement au rhamnose, alors que l'hétéroside reste inaltérable en milieu neutre.

Pour aucun de ces exemples, le génol n'est séparable de l'hétéroside lui-même.

VIII. - Les différences observées dans les conditions d'obtention du sucre par hydrolyse des hétérosides, ainsi que son étude chromatographique, nous ont permis de mettre au point une méthode relativement simple de diagnose de quelques médicaments cardiotoniques hétérosidiques.

Nous avons auparavant précisé le Rf de l'oléandrose qui, d'après la littérature, est identique à celui du cymarose, et, par conséquent, n'est pas spécifique ; nous avons pu établir une méthode de séparation de ces deux sucres.

Vu :
Pour le Doyen :
L'Assesseur,
L. CHELLE.

Vu, bon à imprimer :
Le Président,
P. MESNARD.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 16 juin 1951.
Le Recteur,
E. DELAGE.

BIBLIOGRAPHIE

1. Tswett. — C.R. 1899-129-607; 1901-131-842; Ber., 1907-25-71.
2. Martin et Synge. — *Biochem J.*, 1941-35-1358.
3. Consden, Gordon et Martin. — *Biochem J.*, 1944-38-224.
4. Schönbein et Grappelsröder. — Cf. N° 19.
5. Day. — Cf. « Progress in chromatographie 1938-1947 », par L. Zechmeister.
6. Kuhn et Lederer. — Ber., 1931-64-1349.
7. Reichstein. — *Hélv. Chim. Acta*, 1938-21-1197; 1939-22-1212.
8. Lederer. — *Bull. Soc. Chim. France*, 1939-6-902.
9. Tiselius. — Cf. Lederer « Progrès récents en chromatographie », 1949. Hermann et Cie, Editeurs (Paris).
10. Williams et Kirby. — *Science*, 1948-107-481.
11. Jaminet. — *J. Pharm. Belgique*, 1950-9-10-297.
12. Munier et Machebœuf. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949-31-1144; *ibid.* 1950-32-192.
13. Partridge. — *Nature*, 1946-158-270; *Biochem J.*, 1948-42-238 et 251.
14. Blass, Machebœuf et Nunez. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1950-32-130.
15. Montreuil. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949-31-1639.
16. Renard. — *Bull. Soc. Chim. Belgique*, 1949-58-301.
17. Dent. — *Biochem J.*, 1948-43-169.
18. Polson et Wyckoff. — *Science*, 1948-108-501.
19. Kayser et Storck. — *Bull. Soc. Pharm. Nancy*, 1949-2-1.

20. Kedde. — Thèse (Pharm.), Leyde 1946; *Pharm. Tijdschr.*, 1947-169, 182.

21. Legal. — Cf. 22.

22. Jacobs, Hoffman et Gustus. — *J. Biol. Chem.*, 1926-70-1.

23. Elderfield. — *J. Org. Chem.*, 1941-6-273.

24. Hardegger, Heusser et Blank. — *Hélv. Chim. Acta*, 1946-29-477.

25. Baljet. — *Schweitz. Apoth. Ztg.*, 1918-56-71.

26. Bell et Krantz. — *J. Pharm. exp. Therap.*, 1945-83-213; 1946-87-198.

27. Wasicky. — *Arch. der Pharm.*, 1926-264-92.

28. Lendle et Schmelzer. — *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1935-177-623.

29. Morel et Marthoud. — *Lyon Pharm.*, 1935-102 et Marthoud : Thèse (Pharm.), Lyon 1935.

30. Anderson et Chen. — *J. Amer. pharm. Ass.*, 1946-35-353.

31. Zimmermann. — *Münch. med. Woch.*, 1942-p. 360.

32. Pesez. — *Bull. Soc. Chim. France*, 1947-14-911.

33. Warren, Howland et Green. — *J. Amer. Pharm. Ass.*, 1948-37-186.

34. Ehrlich et Herter. — *Hoppe. Seyl. Z.*, 1904-41-329.

35. Feigl et Frehden. — Mikrochemie 1934-16-79.

36. Mc Chesney, Nachod, Auerbach et Laquer. — *J. Amer. Pharm. Ass.*, 1948-9-364.

37. Svendsen et Jensen. — *Pharm. Acta. Helv.*, 1950-718-241.

38. Petit, Pesez, Bellet et Amiard. — *Bull. Soc. Chim., France*, 1950-17-288.

39. Lafon. — *C.R.*, 1885-100-1463.

40. Charonnat. — *J.P.C.*, 1940-41-558.

41. Keller. — *Ber. d. Pharm. Ges.*, 1895-5-275.

42. Cloetta et Fisher. — *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1906-54-294.

43. James, Laquer et Mc Intyre. — *J. Amer. Pharm. Ass.*, 1947-36-1.

44. Sanchez. — *J.P.C.*, 1936-12-549.

45. Binz. — *Arch. int. Pharmacod. et Ther.*, 1904-12-337.

46. Brissemoret-Derrien. — Cf. 47.

47. Garnier. — *J.P.C.*, 1908-27-369.

48. Arreguine et Pasqualis. — *Rev. Univ. nac. Cordoba*, 1945-32-439.

49. Ulrix. — *J. Pharm. Belgique*, 1948-3-2.

50. Fröhde. — *Arch. des Pharm.*, 1866-176-54.

51. Wasicky. — *Z. Anal. Chem.* 1915-54.393; *J.P.C.*, 1917-15-54.

52. Van Urk. — *Ph. Week*, 1929-66-473; *C.I.*, 1930-23-131.

53. Malowan. — *Analyst.*, 1950-75-338.

54. Mesnard. — *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1951-1-20.

55. Schmiedeberg. — *Arch. exp. Path. Pharm.* 1883-16-148.

56. Leulier. — *J.P.C.*, 1911-7; 1912-7.

57. Windaus. — *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1928-135-253.

58. Tanret. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932-14-708.

59. Mesnard et Devèze. — *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1950-3-114.

60. Jones, Hirst et Hough. — *J. Chem. Soc.* 1949-928.

61. Windaus et Schwarte. — *Ber. d. Chem. Ges.*, 1925-58-1515.

62. Mesnard et Devèze. — *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1951-1-22.

63. Cortési (J.-R.). — Thèse doctorat médecine, Bordeaux 1950.

TABLE DES MATIERES

	Pages
Introduction	1
Première partie. - **Etudes préliminaires.**	2
Chapitre I. - *Généralités sur la chromatographie*	2
A. - Chromatographie sur colonne	3
B. - Chromatographie sur papier	5
Chapitre II. - *Réactions colorées des hétérosides cardiotoniques et de leurs produits d'hydrolyse*	9
A. - Digitaline	9
1° Réactions dues aux génols	9
2° Réactions dues au digitoxose	14
3° Réactions dues aux génols et au sucre	16
B. - Lanata-hétéroside C	19
C. - Oléandrine	19
D. - Ouabaïne	20
Chapitre III. - Application des réactions étudiées à la chromatographie sur papier	21
Deuxième partie. - **Recherches sur la digitaline officinale et le lanata hétéroside C**	23
Digitaline	23
Chapitre I. - *Etude de la digitaline par chromatographie sur papier*	25
A. - Chromatographie à une dimension	28
B. - Chromatographie à deux dimensions	28
Chapitre II. - Etude des produits d'hydrolyse de la digitaline	30
A. - Génols	30
B. - Digitoxose	32
1° Etude du digitoxose pur	32
2° Caractérisation du digitoxose dans les produits d'hydrolyse de la digitaline	33
Chapitre III. - *Recherche des saponosides dans la digitaline officinale*	37
Lanata-hétéroside C	39
Troisième partie. - **Recherches sur l'Oléandroside et l'Ouabaïne**	40
Chapitre I. — *Oléandrine*	40

Pages

A. - Etude de l'oléandrine 40
a) Chromatographie à une dimension 40
b) Chromatographie à deux dimensions 41
c) Essai de fractionnement de l'oléandrine par différents solvants 41

B. - Etude des produits d'hydrolyse 43
a) Génols 43
b) Oléandrose 43
1° Etude de l'oléandrose pur 43
2° Caractérisation de l'oléandrose dans les produits d'hydrolyse de l'oléandrine 43
Chapitre II. — *Ouabaïne* 44

Quatrième partie. - **Essais de préparations galéniques de quelques hétérosides cardiotoniques** 45

Chapitre I. - Digitaline et Lanata hétéroside C 46
Digitaline. 46
a) Extraction 46
1° Granules et comprimés 46
2° Soluté à 1 p. 1.000 46
b) Contrôles 47
Lanata-hétéroside C 49

Chapitre II. - *Oléandrine et Ouabaïne.* 50
Oléandrine 50
Ouabaïne 52

Chapitre III. - *Diagnose d'un médicament cardiotonique hétérosidique* 54

Conclusion. 56

Bibliographie. 59

Imp. Vve VASSAL, 58, rue du Sablonat, Bordeaux